



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 02 337 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 101 02 337.5
㉑ Anmeldetag: 19. 1. 2001
㉒ Offenlegungstag: 25. 7. 2002

⑤① Int. Cl. 7:
C 12 N 15/53
C 12 N 15/82
C 12 Q 1/68
A 01 H 5/00
A 61 K 7/00
C 07 K 14/405
C 07 K 16/00
A 61 K 39/395
C 07 H 21/04
C 12 P 7/64
// A23K 1/16, A23L
1/30

DE 101 02 337 A 1

⑦① Anmelder:
BASF Plant Science GmbH, 67065 Ludwigshafen,
DE

⑦② Erfinder:
Lerchl, Jens, Dr., Svalöv, SE; Renz, Andreas, Dr.,
67117 Limburgerhof, DE; Heinz, Ernst, Prof. Dr.,
22609 Hamburg, DE; Domerque, Frederic, Dr.,
22761 Hamburg, DE; Zähringer, Ulrich, Dr., 22926
Ahrensburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, neue Biosynthesegene sowie neue pflanzliche Expressionskonstrukte

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft weiterhin die vorteilhafte Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 18 im Verfahren sowie zur Herstellung eines transgenen Organismus, bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit ungesättigten C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin neue Desaturasen mit den in den Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 11 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga sowie Genkonstrukte, die diese Gene oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfaßt sowie ihre Verwendung allein oder in Kombination mit Biosynthesegenen polyungesättigter Fettsäuren wie vorteilhaft in SEQ ID NO: 7 und SEQ ID NO: 9 dargestellt. Außerdem betrifft die Erfindung isolierte Nukleinsäuresequenzen; Expressionskassetten, enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, Vektoren und transgene Organismen, enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen sowie Triglyceride mit einem ...

DE 101 02 337 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft weiterhin die vorteilhafte Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder 11 im Verfahren sowie zur Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit ungesättigten C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren.

[0002] Die Erfindung betrifft weiterhin neue Desaturasen mit den in den Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 11 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga sowie Genkonstrukte, die diese Gene oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfasst sowie Ihre Verwendung allein oder in Kombination mit Biosynthesegeordneten polyungesättigter Fettsäuren wie vorteilhaft in SEQ ID NO: 7 und SEQ ID NO: 9 dargestellt.

[0003] Außerdem betrifft die Erfindung isolierte Nukleinsäuresequenzen; Expressionskassetten enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, Vektoren und transgene Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und deren Verwendung.

[0004] Die Erfindung betrifft zudem Multiexpressionskassetten zur samenspezifischen Expression und Vektoren oder Organismen, die ein Desaturasegen allein oder in Kombination mit weiteren Desaturasen mit der Sequenz SEQ ID NO: 7 und/oder Elongasegenen mit der Sequenz ID NO: 9 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga unter Verwendung besagter Expressionskassetten umfassen.

[0005] Eine Reihe von Produkten und Nebenprodukten natürlich vorkommender Stoffwechselprozesse in Mikroorganismen, tierischen und pflanzlichen Zellen sind für viele Industriezweige, einschließlich der Futtermittel-, Nahrungsmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie, nützlich. Zu diesen gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichneten Molekülen gehören beispielsweise Lipide und Fettsäuren, unter denen eine beispielhafte Klasse die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. PUFAs haben weiterhin einen positiven Einfluss auf den Cholesterinspiegel im Blut von Menschen und eignen sich daher zum Schutz gegen Herzkrankheiten. So finden sie in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

[0006] Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen wie *Thraustochytrien* oder *Schizochytrien*-Stämme, Algen wie *Phaeodactylum tricornutum* oder *Cryptocodinium*-Arten, Ciliaten, wie *Stylonychia* oder *Colpidium*, Pilze, wie *Mortierella*, *Entomophthora* oder *Mucor*. Durch Stamms Selektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren.

[0007] Alternativ kann die Produktion von Feinchemikalien geeigneterweise über die Produktion von Pflanzen, die so entwickelt sind, dass sie die vorstehend genannten PUFAs herstellen, im großen Maßstab durchgeführt werden. Besonders gut für diesen Zweck geeignete Pflanzen sind Ölfuchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch und Nachtkerze. Aber auch andere Nutzpflanzen, die Öle oder Lipide und Fettsäuren enthalten, sind gut geeignet, wie in der eingehenden Beschreibung dieser Erfindung erwähnt. Mittels herkömmlicher Züchtung ist eine Reihe von Mutantpflanzen entwickelt worden, die ein Spektrum an wünschenswerten Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen produzieren. Die Selektion neuer Pflanzensorten mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitaufwändiges und schwieriges Verfahren oder sogar unmöglich, wenn die Verbindung in der entsprechenden Pflanze nicht natürlich vorkommt, wie im Fall von mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀-Fettsäuren und C₂₂-Fettsäuren und solchen mit längeren Kohlenstoffketten.

[0008] Aufgrund der positiven Eigenschaften ungesättigter Fettsäuren hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-Desaturase, in WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022 und WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144–20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200–203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659 beschrieben. In WO 96/13591 wird eine Δ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141–12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777–792).

[0009] In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611–614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, dass die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

[0010] Weder in Hefen noch in Pflanzen werden natürlicherweise mehrfach ungesättigte C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure

(EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) hergestellt.

[0011] Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen. Keines der bisher bekannten biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren liefert die vorge-

[0012] Es bestand daher die Aufgabe weitere Enzyme für die Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Und diese Enzyme gegebenenfalls mit anderen Enzymen in einem Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu verwenden. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern mit einem erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass man mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist,

in einen Fettsäureester produzierenden Organismus einbringt, anzieht und die dem Organismus enthaltenden Fettsäureester isoliert.

[0013] Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -5-, Δ -6- oder Δ -12-Desaturaseaktivität codieren.

[0014] Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt. Bevorzugt enthalten diese Fettsäuremoleküle drei, vier oder fünf Doppelbindungen und führen vorteilhaft zur Synthese von Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA).

[0015] Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, isoliert werden.

[0016] Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßen Verfahren kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen wie prokaryontische oder eukaryontische Mikroorganismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien, Pilze, Hefen, Algen, Ciliaten, tierische oder pflanzliche Zellen, Tiere oder Pflanzen wie Moose, zweikeimblättrige oder eikeimblättrige Pflanzen in Frage. Vorteilhaft werden Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, die zu den Öl-produzierenden Organismen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Mikroorganismen wie *Cryptocodium*, *Thraustochytrium*, *Phaeodactylum* und *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Cryptocodium* sowie andere Algen oder Pilze sowie Tiere oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Sojabohne, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor, Nachtkerze, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor oder Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

[0017] Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet entweder die Züchtung eines geeigneten transgenen Organismus bzw. transgenen Mikroorganismus oder die Züchtung von transgenen Pflanzenzellen, -geweben, -organen oder ganzen Pflanzen, umfassend die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gegebenenfalls in Verbindungen mit den in SEQ ID NO: 7 und/oder SEQ ID NO: 9 dargestellten Sequenzen allein oder in Kombination mit Sequenzen von Expressionskonstrukten aus SEQ ID NO: 13–17 oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga oder ein Genkonstrukt, das die SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 ggf. in Verbindung mit SEQ ID NO: 7 und/oder 9 oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfasst, oder einen Vektor, der diese Sequenz oder das Genkonstrukt umfasst, welches die Expression erfindungsgemäßer Nukleinsäuremoleküle herbeiführt, so dass eine Feinchemikalie produziert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle, die eine solche erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei eine Zelle mit einer Desaturasenukleinsäuresequenz, einem Genkonstrukt oder einem Vektor, welche die Expression einer erfindungsgemäßen Desaturasenukleinsäure allein oder in Kombination herbeiführen, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Feinchemikalie aus der Kultur. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform gehört die Zelle zur Ordnung der Ciliaten, zu Mikroorganismen, wie Pilzen, oder zum Pflanzenreich, insbesondere zu Ölfruchtpflanzen, besonders bevorzugt sind Mikroorganismen oder Ölfruchtpflanzen beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Soja, Safflower (Distel), Sonnenblumen oder Borretsch.

[0018] Unter transgen im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, daß die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder das

die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind die oben genannten transgenen Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen.

5 **[0019]** Aus den im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureestern lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkalibehandlung wie wässrige KOH oder NaOH vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z. B. H₂SO₄.

10 **[0020]** Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Öle, Lipide und/oder Fettsäuren, die mindestens zwei Doppelbindungen in den Fettsäuremolekülen bevorzugt drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, die nach dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden. Auch sind Zusammensetzungen, die die genannten Öl-, Lipid- und/oder Fettsäuren enthalten, sowie die Verwendung der Öle, Lipide und/oder Fettsäuren oder der Zusammensetzungen in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika ein weiterer Erfindungsgegenstand.

15 **[0021]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls durch einen Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, welche die erfindungsgemäßen Desaturaseaktivität allein oder in Kombination oder die Desaturasenukleinsäureexpression moduliert, so dass eine zellassoziierte Aktivität relativ zu der gleichen Aktivität in Abwesenheit der Substanz verändert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird/werden ein oder zwei Stoffwechselweg(e) der Zelle für Lipide und Fettsäuren, Co-faktoren und Enzyme moduliert oder der Transport von Verbindungen über diese Membranen moduliert, so dass die Ausbeute oder die Rate der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert ist. Die Substanz, welche die Desaturaseaktivität moduliert, kann eine Substanz sein, welche die Desaturaseaktivität oder Desaturasenukleinsäureexpression stimuliert oder die als Zwischenprodukt bei der Fettsäurebiosynthese verwendet werden kann. Beispiele für Substanzen, welche die Desaturaseaktivität oder Desaturasenukleinsäureexpression stimulieren, sind u. a. kleine Moleküle, aktive Desaturasen sowie desaturasenkodierende Nukleinsäuren, die in die Zelle eingebracht worden sind. Beispiele für Substanzen, welche die Desaturaseaktivität oder -Expression hemmen, sind u. a. kleine Moleküle und Antisense-Desaturasenukleinsäuremoleküle.

20 **[0022]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines Wildtyp- oder Mutanten-Desaturasegens, das entweder auf einem separaten Plasmid gehalten oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird, in eine Zelle. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist.

30 **[0023]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die Ausbeuten modifiziert. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die gewünschte Chemikalie vermehrt, wobei unerwünschte störende Verbindungen vermindert werden können. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die gewünschte Feinchemikalie ein Lipid oder eine Fettsäure, ein Cofaktor oder ein Enzym. Bei besonders bevorzugten Ausführungsform ist diese Chemikalie eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Stärker bevorzugt ist sie ausgewählt aus Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA).

40 **[0024]** Die vorliegende Erfindung stellt neue Nukleinsäuremoleküle bereit, die zur Identifizierung und Isolierung von Desaturasen der PUFA-Biosynthese geeignet sind und zur Modifikation von Ölen, Fettsäuren, Lipiden, von Lipiden stammenden Verbindungen und am stärksten bevorzugt zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden können.

45 **[0025]** Ferner stellt die Erfindung Multiexpressionskassetten und Konstrukte zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genkombinationen in Pflanzen zur Verfügung.

[0026] Mikroorganismen, wie *Cryptocodinium*, *Thraustochytrium*, *Phaeodactylum* und *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Cryptocodinium* sowie andere Algen und Pilze und Pflanzen, insbesondere Ölfruchtpflanzen sind bevorzugte Organismen für das erfindungsgemäße Verfahren.

50 **[0027]** In WO 98/01572, oder in Falcitore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3): 239–251, sowie Dunahay et al., 1995, *Genetic transformation of diatoms*, *J. Phycol.* 31: 10004–1012 und den Zitaten darin werden Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation der obengenannten Mikroorganismen und Ciliaten, Algen oder verwandten Organismen, wie *Phaeodactylum tricornutum*, beschrieben. Dadurch können die oben genannten Nukleinsäuremoleküle im erfindungsgemäßen Verfahren, indem die Organismen zur gentechnologisch verändert werden, verwendet werden, so dass sie bessere oder effizientere Produzenten einer oder mehrerer Feinchemikalien werden. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie kann durch eine direkte Wirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder durch eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden. Unter Feinchemikalien sind im Sinne der Erfindung Fettsäureester, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, zu verstehen. Weiter sind darunter zu verstehen Verbindungen wie Vitamine beispielsweise Vitamin E, Vitamin C, Vitamin B2, Vitamin B6, Pantolacton, Carotinoide wie Astaxanthin, β -Carotin, Zeaxanthin und andere.

60 **[0028]** Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraction akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraction akkumulieren, beson-

ders vorteilhaft zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere in Mikroorganismen, wie den vorstehend erwähnten Mikroorganismen, und Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.

[0029] Weiterhin eignen sich deshalb die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren besonders vorteilhaft zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Triacylglycerol-akkumulierenden Mikroorganismen und zur Identifikation solcher DNA-Sequenzen und den durch sie codierten Enzyme in anderen Arten, die sich zur Modifikation der Biosynthese von Vorläufermolekülen von PUFAs in den entsprechenden Organismen eignen.

[0030] Mikroorganismen wie *Cryptocodium cohnii*, *Thraustochytrium* und *Phaeodactylum*-Species sind Mikroorganismen, die PUFAs wie ARA, EPA oder DHA in Triacylglycerolen akkumulieren können. *Thraustochytrien* sind phylogenetisch auch eng verwandt mit *Schizochytrien* Stämmen. Die Fähigkeit, anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren Desaturasen zu identifizieren, z. B. die Vorhersage der Substratspezifität von Enzymen, kann daher von signifikanter Bedeutung sein. Ferner können diese Nukleinsäuremoleküle als Bezugssequenzen zur Kartierung verwandter Genome oder zur Ableitung von PCR-Primern dienen.

[0031] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodieren für Proteine, die als Desaturasen bezeichnet werden. Diese Desaturasen können beispielsweise eine Funktion ausüben, die am Stoffwechsel (z. B. an der Biosynthese oder am Abbau) von Verbindungen, die zur Lipid- oder Fettsäuresynthese notwendig sind, wie PUFAs, beteiligt sind oder am Transmembrantransport einer oder mehrerer Lipid-/Fettsäureverbindungen entweder in die oder aus der Zelle teilnehmen.

[0032] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen codieren für Desaturasen, die zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vorzugsweise mit mehr als sechzehn, achtzehn oder zwanzig Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet sind, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure für ein Enzym codiert, das Doppelbindungen in die Δ -5-Position, in einem anderen Fall in die Δ -6-Position und in einem weiteren Fall in die Δ -12-Position einführen kann. Mithilfe dieser Nukleinsäuren können hohe Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraction erhalten werden. Weiterhin wurden weitere Desaturasen isoliert, die allein oder zusammen mit einer Δ -4-Desaturase für ein Verfahren zur Produktion polyungesättigter Fettsäuren genutzt werden können. Dabei ist in der Anmeldung unter dem Singular d. h. unter einem Desaturasegen oder -Protein auch der Plural d. h. die Desaturasegenen oder -Proteinen zu verstehen.

[0033] Die Herstellung einer Triensäure mit C_{18} -Kohlenstoffkette mithilfe von Desaturasen konnte bisher gezeigt werden. In diesen literaturbekannten Verfahren wurde die Herstellung von γ -Linolensäure beansprucht. Bisher konnte jedoch niemand die Herstellung sehr langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren (mit C_{20} - und längerer Kohlenstoffkette sowie von Triensäuren und höher ungesättigten Typen) allein durch modifizierte Organismen zeigen.

[0034] Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettiger PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C_{18} -Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C_{20} -Fettsäuren, und nach zwei, drei und vier Elongationsrunden zu C_{22} -, C_{24} - oder C_{26} -Fettsäuren. Die in dieser Erfindung offenbarten Nukleinsäuresequenzen, die für verschiedene Desaturasen codieren, können im Konzert mit Elongasen zu sehr langkettigen, polyungesättigten Fettsäuren führen. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasen führt vorzugsweise zu C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C_{18} - und/oder C_{20} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Molekül. Die Fettsäureelongation kann durch Kombination der erfindungsgemäßen Desaturasen mit einer Elongaseaktivität erfolgen, wobei die durch die in SEQ ID NO: 9 codierte Elongase vorteilhaft verwendet werden kann. Nachdem die Verlängerung mit dem erfindungsgemäßen Enzym(en) stattgefunden hat, können weitere Desaturierungsschritte wie z. B. eine solche in Δ -5-Position erfolgen. Auch die Kombination mit anderen Elongasen wie solche, die zu einer Verlängerung von C_{18} - auf C_{20} - oder von C_{20} - auf C_{22-24} -Ketten wie in WO 0012720 offenbart führt, kann Verwendung finden und/oder einer Desaturase mit Aktivität für Δ -4-Position kann vorteilhaft eingesetzt werden, um die hoch desaturierten Fettsäuren zu erhalten. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit einem höheren Desaturierungsgrad, wie Dihomogamma-Linolensäure, Docosadiensäure, Arachidonsäure, ω 6-Eicosatriendihomo- γ -linolensäure, Eicosapentaensäure, ω 3-Eicosatriensäure, ω 3-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate der erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure; 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, Pinolensäure, α - oder γ -Linolensäure oder Stearidonsäure sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ -Linolensäure und/oder α -Linolensäure sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Arachidonsäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Die C_{18} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglyceride, Diacylglyceride oder Triacylglyceride, verlängert werden.

[0035] Für die menschliche Ernährung ist konjugierte Linolsäure "CLA" von besonderer Bedeutung. Unter CLA versteht man insbesondere Fettsäuren wie $C_{18} : 2^{9 \text{ cis}, 11 \text{ trans}}$ oder das Isomer $C_{18} : 2^{10 \text{ trans}, 12 \text{ cis}}$, die aufgrund menschlicher Enzymsysteme nach Aufnahme im Körper desaturiert bzw. elongiert werden können und zu gesundheitsfördernden Effekten beitragen können. Mit den erfindungsgemäßen Desaturasen (Δ -12-Desaturase) können auch solche konjugierten Fettsäuren mit wenigstens zwei Doppelbindungen im Molekül desaturiert werden und damit solche gesundheitsfördernden Fettsäuren der menschlichen Ernährung zugeführt werden. Weitere Beispiel für konjugierte Fettsäuren sind alpha-Parinarinsäure, Punicasäure, Eleostearinsäure und Calendulasäure.

[0036] Unter der Verwendung von Klonierungsvektoren in Pflanzen und bei der Pflanzentransformation, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71–119 (1993); F. F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15–38; B. Jenes et al., Techniques

for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205–225, lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese ein besserer oder effizienterer Produzent eines oder mehrerer von Lipiden hergeleiteter Produkte, wie PUFAs, wird.

5 Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion eines von Lipiden hergeleiteten Produktes, wie PUFAs, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.
[0037] Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen Desaturaseproteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität des Desaturaseproteins oder -Gens sowie von Genkombinationen von Desaturasen und Elongasen kann erhöht sein, so dass größere Mengen dieser Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen des entsprechenden Gens fehlte. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d. h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z. B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

10 **[0038]** Durch das Einbringen eines erfindungsgemäßen Desaturasegens oder mehrerer Desaturasegene in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesfluss zum Endprodukt erhöhen, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöhen oder de novo schaffen. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Feinchemikalien (z. B. Fettsäuren, polaren und neutralen Lipiden) nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Fettsäuren und Lipide sind selbst als Feinchemikalien wünschenswert; durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Pflanzen oder Mikroorganismen zu steigern.

15 **[0039]** Die Mutagenese der/des erfindungsgemäßen Desaturasegene(s) kann weiterhin zu einem Desaturaseprotein mit geänderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien direkt oder indirekt beeinflussen. Beispielsweise kann die Anzahl oder Aktivität der/des erfindungsgemäßen Desaturasegens(e) gesteigert werden, so dass die normalen Stoffwechselabfälle oder -nebenprodukte der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie andere Moleküle oder Prozesse innerhalb der Zelle (welche die Lebensfähigkeit der Zelle senken würden) zerstören oder die Biosynthesewege der Feinchemikalie stören würden (wodurch die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten Feinchemikalie verringert wird). Ferner können die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst toxisch für die Zelle sein oder Enzym-Rückkopplungsmechanismen, wie die allosterische Regulation, stören, beispielsweise könnte sie durch Steigerung der Aktivität oder Anzahl anderer stromabwärts folgender Enzyme oder Entgiftungsenzyme des PUFA-Wegs die Allokation der PUFA in die Triacylglycerin-Fraktion steigern, man könnte die Lebensfähigkeit von Saatzellen erhöhen, was wiederum zu besserer Entwicklung von Zellen in Kultur oder zu Saaten führt, die die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Das erfindungsgemäße Desaturasegen kann auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen der verschiedenen Lipid- und Fettsäuremoleküle hergestellt werden. Dies kann eine einschneidende Wirkung auf die Lipidzusammensetzung der Membran der Zelle haben und erzeugt neue Öle zusätzlich zum Auftreten neusynthetisierter PUFAs. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität erheblich verändern. Änderungen der Membranfluidität können sich auf den Transport von Molekülen über die Membran sowie auf die Unversehrtheit der Zelle auswirken, die beide eine entscheidende Wirkung auf die Produktion von Feinchemikalien besitzen. In Pflanzen können diese Änderungen überdies auch andere Merkmale, wie Toleranz gegenüber abiotischen und biotischen Stresssituationen, beeinflussen.

20 **[0040]** Biotische und abiotische Stresstoleranz ist ein allgemeines Merkmal, das man an ein breites Spektrum von Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Öl- und Faserlein, Raps und Canola, Lein, Maniok, Pfeffer, Sonnenblume und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, vererben möchte. Diese Feldfrüchte sind als weitere erfindungsgemäße Ausführungsform auch bevorzugte Zielpflanzen für die Gentechnologie. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Sojabohne, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Lein, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Alfalfa, oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee).

25 **[0041]** Folglich betrifft ein Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle (z. B. cDNAs), umfassend Nukleotidsequenzen, die eine Desaturase oder mehrere Desaturasen oder biologisch aktive Teile davon codieren, oder Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisierungs sonden zum Nachweis oder zur Amplifikation desaturasekodierender Nukleinsäuren (z. B. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Nukleinsäuremolekül eine der in Sequenz ID NO: 1 bzw. 3 und 5 dargestellten Nukleotidsequenzen oder die kodierende Region oder ein Komplement einer dieser Nukleotidsequenzen. Bei anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine Nukleotidsequenz, wie in der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellt, oder einen Teil davon hybridisiert oder zu mindestens etwa 50%, vorzugsweise mindestens etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr homolog dazu ist. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen

kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 dargestellten Aminosäuresequenzen. Das bevorzugte erfindungsgemäße Desaturasegen besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen Desaturaseaktivitäten.

[0042] Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, wobei das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon eine Desaturaseaktivität beibehält. Vorzugsweise behält das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül kodiert wird, die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Bei einer Ausführungsform ist das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein zu mindestens etwa 50%, vorzugsweise mindestens etwa 60% und stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein Vollängen-Protein, das im wesentlichen in Teilen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 (die von dem in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten offenen Leserahmen herrührt) ist.

[0043] Bei anderen Ausführungsformen umfasst die isolierte Desaturase eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50% homolog zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, wobei desaturierte C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Kohlenstoffketten mit Doppelbindungen an mindestens zwei Stellen gemeint ist.

[0044] Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform rührt das isolierte Nukleinsäuremolekül von *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646 her und kodiert ein Protein (z. B. ein Desaturasefusionsprotein), das eine biologisch aktive Domäne enthält, die zu mindestens etwa 50% oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält oder zumindest eine der Desaturierungsaktivitäten resultierend in PUFAs wie GLA, ALA, Dihomo-gamma Linolensäure, ARA, EPA oder DHA oder deren Vorläufermoleküle besitzt, und umfasst auch heterologe Nukleinsäuresequenzen, die ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Proteine kodieren.

[0045] Alternativ kann die isolierte Desaturase eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert, z. B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder zu mindestens etwa 50%, vorzugsweise mindestens etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr homolog dazu ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die bevorzugten Desaturaseformen ebenfalls eine der hier beschriebenen Desaturaseaktivitäten besitzen.

[0046] Bei einer anderen Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15, 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 17 umfasst. Vorzugsweise entspricht das isolierte Nukleinsäuremolekül einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül, Stärker bevorzugt kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül natürlich vorkommende *Phaeodactylum*-Desaturase oder einen biologisch aktiven Teil davon.

[0047] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind Expressionskassetten, die die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit den Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 in den verschiedenen Organismen wie Mikroorganismen beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, Ciliaten, Algen oder tierische oder pflanzliche Zellen oder in Tieren oder Pflanzen ermöglichen.

[0048] Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) sind die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Δ -5-Desaturase-/ Δ -6-Desaturase und/oder Δ -12-Desaturasegene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.

[0049] Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren

und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

[0050] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, z. B. rekombinante Expressionsvektoren, die mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind, insbesondere Mikroorganismen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe, -organe oder ganze Pflanzen. Bei einer Ausführungsform kann eine solche Wirtszelle Feinchemikalien-Verbindungen, insbesondere PUFAs, speichern; zur Isolation der gewünschten Verbindung werden die Zellen geerntet. Die Verbindung (Öle, Lipide, Triacylglyceride, Fettsäuren) oder die Desaturase können dann aus dem Medium oder der Wirtszelle, welche bei Pflanzen Zellen sind, die Feinchemikalien enthalten oder speichern, am stärksten bevorzugt Zellen von Speichergeweben, wie Samenhüllen, Knollen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe isoliert werden.

[0051] Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine genetisch veränderte transgene Pflanze, bevorzugt ein Ölfruchtpflanze, wie vorstehend erwähnt, besonders bevorzugt eine Raps- oder Leinpflanze, in die ein Desaturasegen eingebracht worden ist. Bei einer Ausführungsform ist das Genom von Raps oder Lein durch Einbringen eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das eine Wildtyp- oder mutierte Desaturasesequenz kodiert, als Transgen verändert worden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes Desaturasegen im Genom des Spenderorganismus *Phaeodactylum* Mutagenese und Detektion mittels DNA-Sequenzen funktionell zerstört worden oder mittels Antisense-Technologie reprimiert worden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird Raps oder Lein auch zur Produktion einer gewünschten Verbindung, wie Lipiden und Fettsäuren, wobei PUFAs besonders bevorzugt sind, verwendet.

[0052] Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das Moos *Physcomitrella patens* zur Demonstration der Funktion eines Desaturasegens unter Verwendung homologer Rekombination auf der Basis der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuren verwendet werden.

[0053] Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes Desaturasegen oder einen Teil, z. B. einen biologisch aktiven Teil, davon. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann die isolierte Desaturase oder ein Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über dessen/deren Membranen teilnehmen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die isolierte Desaturase oder der Teil davon ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 das dieses Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzenzellen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält.

[0054] Die Erfindung stellt auch eine isolierte Präparation einer Desaturase in Form eines Rohextraktes oder als reines Protein bereit.

[0055] Das Desaturasepolypeptid oder ein biologisch aktiver Teil davon kann vorteilhaft funktionsfähig mit einem weiteren Polypeptid, das eine andere enzymatische Aktivität als die Desaturasen hat beispielsweise eine Elongase-, Acyltransferase- oder sonstige Aktivität verbunden werden, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird. Vorteilhaft hat dieses Fusionsprotein eine Aktivität, die sich von derjenigen der Desaturase allein unterscheidet. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen nimmt dieses Fusionsprotein am Stoffwechsel von Verbindungen, die zur Synthese von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teil. Besonders vorteilhaft moduliert das Einbringen dieses Fusionsproteins in einer Wirtszelle die Produktion einer gewünschten Verbindung innerhalb einer und durch die Zelle. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Fusionsproteine auch Δ -4-, Δ -5- oder Δ -6-, Δ -8-, Δ -15-, Δ -17- oder Δ -19-Desaturaseaktivitäten allein oder in Kombination. Insbesondere solche Genkombinationen sind bevorzugte Ausführungsformen, die aus SEQ ID NO: 7 oder 9 gewählt sind, bzw. Teilen davon, Derivate oder ihren Homologen. Insbesondere solche Kombinationen sind bevorzugt, die die vollständige Proteinaktivität wie in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 enthalten und in Multiexpressionskassetten definiert durch SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16 und 17 eingefügt zur Transformation von Pflanzen und Expression in Pflanzen geeignet sind.

Eingehende Beschreibung der Erfindung

[0056] Ein erfindungsgemäßer Gegenstand ist/sind isolierte Nukleinsäuresequenz(en), die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

[0057] Weiterhin betrifft die Erfindung eine Aminosäuresequenz, die durch die oben genannte(n) Nukleinsäuresequenz(en) codiert werden (für die Erfindung soll der Singular den Plural und umgekehrt umfassen). Speziell betrifft die Erfindung Aminosäuresequenzen, die durch die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte Sequenz codiert werden.

[0058] Die vorliegende Erfindung stellt Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit Desaturaseaktivität bereit, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen in dem Moos *Physcomitrella patens* oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen lassen sich zur

Modulation der Produktion von Feinchemikalien aus Organismen, beispielsweise Mikroorganismen, wie Ciliaten, Pilzen, Hefen, Bakterien, Algen, und/oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z. B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwenden oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z. B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien beeinflussen kann). Aspekte der Erfindung sind nachstehend weiter erläutert.

I. Feinchemikalien und PUFAs

[0059] Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und umfasst Moleküle, die durch einen Organismus produziert worden sind und Anwendungen in verschiedenen Industrien finden, wie, aber nicht beschränkt auf, die pharmazeutische, Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen Lipide, Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme usw. (wie z. B. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561–612, in *Biotechnology* Bd. 6, Rehm et al., Hrsgb., VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (z. B. Arachidonsäure), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, Vitamins, S. 443–613 (1996) VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen; und Ong, A. S., Niki, E., & Packer, L. (1995) Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research – Asien, abgehalten am 1.–3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086, und darin angegebenen Literaturstellen beschriebenen Chemikalien. Der Stoffwechsel und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

[0060] Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseeenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Membran hat. Es kann angenommen werden, dass PUFAs nicht nur einfach in Triacylglycerin, sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

[0061] Die Synthese von Membranen ist ein gut charakterisierter Prozess, an dem eine Anzahl von Komponenten, einschließlich Lipiden als Teil der Bilayer-Membran, beteiligt sind. Die Produktion neuer Fettsäuren, wie PUFAs, kann daher neue Eigenschaften von Membranfunktionen innerhalb einer Zelle oder eines Organismus erzeugen.

[0062] Zellmembranen dienen einer Vielzahl von Funktionen in einer Zelle. Zuerst und in erster Linie grenzt eine Membran den Inhalt einer Zelle von der Umgebung ab, wodurch sie der Zelle Integrität verleiht. Membranen können auch als Schranken gegenüber dem Einstrom gefährlicher oder unerwünschter Verbindungen und auch gegenüber dem Ausstrom gewünschter Verbindungen dienen.

[0063] Detailliertere Beschreibungen und Beteiligungen von Membranen und die beteiligten Mechanismen siehe in: Bamberg, E., et al. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, *Q. Rev. Biophys.* 26: 1–25; Gennis, R. B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: *Biomembranes, Molecular Structure and Function*, Springer: Heidelberg, S. 270–322; und Nikaido, H., und Saier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, *Science* 258: 936–942, und den in jeder dieser Literaturstellen enthaltenen Zitate.

[0064] Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F. C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D. C., S. 612–636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57: 522–542 und die enthaltenen Literaturstellen).

[0065] Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C₁₈-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C₂₀ und C₂₂ verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe verschiedener Desaturasen, wie Enzymen, welche Δ-12-Desaturase, Δ-15-Desaturase, Δ-6-Desaturase-, Δ-5- und Δ-4-Desaturaseaktivität aufweisen, können Arachidonsäure, Picosapentaensäure und Docosahexaensäure sowie verschiedene andere langkettige PUFAs erhalten, extrahiert und für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden.

[0066] Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen, wie oben erwähnt, die mehrfach ungesättigten C₁₈- bzw. C₂₀-Fettsäuren mehrfach desaturiert werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kodieren erste funktionell aktive Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*, einem Mikroorganismus, der PUFAs in der Triacylglycerolfraktion enthält. Mit den erfindungsgemäßen Desaturasen können Doppelbindungen in die Δ-5-, Δ-6- oder Δ-12-Position eingeführt werden. Die Aktivitäten der erfindungsgemäßen Desaturasen führt vorzugsweise zu C₁₈- + C₂₀-Fettsäuren mit minde-

- stens zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise zu C₂₀-Fettsäuren mit vorteilhaft drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C₂₀ zu C₂₂-Fettsäuren, zu Fettsäuren wie Linolsäure, Docosadiensäure, dihomog-linolensäure, Arachidonsäure, 66-Eicosatriendihomog-linolensäure, Eicosapentaensäure, 63-Eicosatriensäure, 63-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate dieser erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure, 6,9-Octadecadiensäure, Ölsäure, Linolsäure, g-Linolensäure, Pinolensäure, a-Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, g-Linolensäure und/oder a-Linolensäure, dihomog-linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die C₁₈- oder C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße Enzymaktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glykolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Ester, verlängert werden.
- [0067]** Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5): 161-166).
- [0068]** Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19: 149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7: 957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 18: 111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31: 397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256: 181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34: 267-342; Szymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1): 1-16.
- [0069]** Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutical wie PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höheren Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die sie produzieren können, wie in Bakterien, ist im großen und ganzen charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A. S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCs Press, Champaign, IL X, 374 S).
- [0070]** Die oben erwähnten Moleküle sind entweder selbst biologisch aktive Moleküle oder Vorstufen biologisch aktiver Substanzen, die entweder als Elektronenüberträger oder Zwischenprodukte bei einer Vielzahl von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungshilfsstoffe. (Einen Überblick über Struktur, Aktivität und industrielle Anwendungen dieser Verbindungen siehe z. B. in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben verschiedene Funktionen und gesundheitsfördernde Wirkungen, beispielsweise bei koronarer Herzerkrankung, Entzündungsmechanismen, Kinderernährung usw. Veröffentlichungen und Literaturstellen, einschließlich darin zitierter Literaturstellen, siehe in: Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3. Suppl.): 560-569, Takahata et al., Biosc. Biotechnol. Biochem. 1998, 62(11): 2079-2085, Willich und Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120(7): 229ff.

II. Elemente und Verfahren der Erfindung

- [0071]** Die vorliegende Erfindung beruht unter anderem auf der Entdeckung neuer Moleküle, die hier als Desaturasenukleinsäure- und -proteinmoleküle bezeichnet werden, welche eine Wirkung auf die Produktion von Zellmembranen und Lipiden Phaeodactylum tricornutum ausüben und beispielsweise die Bewegung von Molekülen über diese Membranen beeinflussen. Bei einer Ausführungsform nehmen die Desaturasemoleküle am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen teil oder beeinflussen indirekt den Transport von Molekülen über diese Membranen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasemoleküle zur Regulation der Produktion von Membrankomponenten und des Membrantransports eine Auswirkung auf die Produktion der gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasemoleküle moduliert, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Stoffwechselwege von Mikroorganismen oder Pflanzen, welche die erfindungsgemäßen Desaturasen regulieren, moduliert sind und die Effizienz des Transport von Verbindungen durch die Membranen verändert ist, was entweder direkt oder indirekt die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch Mikroorganismen und Pflanzen moduliert.
- [0072]** Der Begriff "Desaturase" oder "Desaturasepolypeptid" umfasst Proteine, die an der Desaturierung von Fettsäuren teilnehmen. Beispiele für Desaturasen sind in der SEQ ID NO: 1, 3, 5, 11 oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga offenbart. Die Begriffe Desaturase oder Desaturasenukleinsäuresequenz(en) umfassen Nukleinsäuresequenzen, die eine Desaturase kodieren und bei denen ein Teil eine kodierende Region und ebenfalls entsprechende 5'- und 3'-untranslatierte Sequenzbereiche sein können. Beispiele für Desaturase-Gene sind die in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (zum Beispiel der gewünschten Feinchemikalie), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem

bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z. B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z. B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d. h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z. B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

[0073] Bei einer anderen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für Desaturase-Moleküle codieren, die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus oder in Pflanzen modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen Sequenz die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem Mikroorganismus- oder Pflanzenstamm, die dieses veränderte Protein enthalten, direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität von Desaturasen, die am Transport von Feinchemikalienmolekülen innerhalb oder aus der Zelle beteiligt sind, kann erhöht werden, so dass größere Mengen dieser Verbindungen über Membranen transportiert werden, aus denen sie leichter gewonnen und ineinander umgewandelt werden. Ferner sind Fettsäuren, Triacylglycerine und/oder Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimierung der Aktivität oder Steigern der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen, wie Mikroorganismen oder Pflanzen, zu erhöhen.

[0074] Die Mutagenese des erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kann Desaturasen mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Mikroorganismen oder Pflanzen indirekt beeinflussen. Beispielsweise können erfindungsgemäße Desaturasen, die am Export von Abfallprodukten beteiligt sind, eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so dass die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie die Moleküle in der Zelle schädigen können (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder die Feinchemikalien-Biosynthesewege stören können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie senken würde). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst können ferner für die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Aktivität oder Anzahl von Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern kann, was wiederum zu einer größeren Anzahl an Zellen in der Kultur führt, welche die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Die erfindungsgemäßen Desaturasen können auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Integrität der Zelle beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien aus Mikroorganismen und Pflanzen in Fermentationskultur im großen Maßstab hat. Pflanzenmembranen verleihen spezifische Eigenschaften, wie Toleranz gegenüber Wärme, Kälte, Salz, Trockenheit sowie Toleranz gegen Pathogene, wie Bakterien und Pilze. Daher kann die Modulation der Membrankomponenten eine grundlegende Wirkung auf die Überlebensfähigkeit der Pflanzen unter den oben genannten Stressparametern haben. Dies kann über Änderungen in Signalkaskaden oder direkt über die veränderte Membranzusammensetzung erfolgen (siehe zum Beispiel: Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11): 419–426) und Signalkaskaden (siehe Wang 1999, Plant Physiology, 120: 645–651) oder die Kältetoleranz, wie offenbart in WO 95/18222, beeinflussen.

[0075] Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646-Stammes enthalten, der über die Algensammlung der University of Texas, Austin verfügbar ist.

[0076] Die Nukleotidsequenz der *Phaeodactylum tricornutum*-cDNA und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Desaturasen sind in den SEQ ID NO: 1 bis 6 sowie 11 und 12 gezeigt. Es wurden Computeranalysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizieren und/oder identifizieren, die am Stoffwechsel von Zellmembrankomponenten beteiligte Proteine oder am Transport von Verbindungen über Zellmembranen beteiligte Proteine bzw. der PUFA Biosynthese codieren. EST's mit der Datenbankeingabe-NO: PT001070010R und PT001078032R durch die Erfinder stellen die erfindungsgemäßen Sequenzen in SEQ ID NO: 1 und 3 dar. Die Sequenz des Fragments aus EST PT001070010R wurde ermittelt und ist wie dargestellt in SEQ ID NO: 5. Analog ist die Sequenz des Klonen PT001078032R dargestellt in SEQ ID NO: 1. Den Klonen wurden Gennamen zugewiesen. Abkürzungen bedeuten: Pp = *Phycomitrella patens*, Pt = *Phaeodactylum tricornutum*. PT001070010R aus SEQ ID NO: 5 codiert für ein neues Gen homolog zu Δ -12-Desaturase und PT001078032R codiert für eine neuartige Δ -5-Desaturase. Pt_{des6} kann gemäß Beispiel 5a mittels Polymerase Kettenreaktion unter Zuhilfenahme degenerierter Oligonukleotide isoliert werden. Ein so erhaltenes Fragment kann zum Sichten einer cDNA Bank aus *Phaeodactylum tricornutum* isoliert werden und die codierende Region einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ -6-Desaturase erhalten werden. Ein so isoliertes Gen wird in Tabelle 1

als Pt_des6 bezeichnet und ist in SEQ ID NO: 3 dargestellt. Die korrespondierenden Aminosäuresequenzen werden durch Übersetzung des genetischen Codes der Sequenz ID NO: 1, 3 und 5 erhalten und sind als SEQ ID NO: 2, 4 und 6 definiert (siehe auch Tabelle 1). Auch eine weitere Nukleinsäuresequenz, die für eine Δ -12-Desaturase codiert, ist Tabelle 1 zu entnehmen. Sie trägt die Klon-Nummer PT001072031R.

Tabelle 1

	Genname	Klonname	Nukleinsäure SEQ ID NO:	Polypeptid SEQ ID NO:
D5 Desaturase	Pt_des5	PT001078032R	1	2
D6 Desaturase	Pt_des6	Pt_des6	3	4
D12 Desaturase	Pt_des12	PT001070010R	5	6
D6 Desaturase	Pp_des6	Pp_des6	7	8
D6 Elongase	Pp_PSE1	PP001019019F	9	10
Δ 12 Desaturase	Pt_des12.2	PT001072013R	11	12

[0077] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, zu mindestens etwa 50% homolog zu der ausgewählten Aminosäuresequenz, z. B. der gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, kann auch zu mindestens etwa 50 bis 60%, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70% und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80%, 80 bis 90% oder 90 bis 95% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

[0078] Die erfindungsgemäße Desaturase oder der biologisch aktive Teil oder das Fragment davon kann am Stoffwechsel von Lipiden zum Aufbau von Zellmembranen oder Speicherlipiden in Mikroorganismen teilnehmen und in Kombination mit weiteren Genen, insbesondere solchen mit Elongaseaktivität zur Elongation von C_{18} - bzw. C_{20-22} -PUFAs benötigten Aktivitäten beitragen, so dass C_{18} -, C_{20} -, C_{22} - oder C_{24} -PUFAs sowie verwandte PUFAs erhalten werden. Dabei können erfindungsgemäße Desaturasen in Kombination mit Elongasen und anderen Desaturasen in erfindungsgemäßen Expressionskassetten kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen mithilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

[0079] Verschiedene Aspekte der Erfindung sind eingehender in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

[0080] Eine Ausführungsform der Erfindung sind isolierte Nukleinsäuren, die von PUFA produzierenden Mikroorganismen stammen und für Polypeptide kodieren, die C_{18} - oder C_{20-22} -Fettsäuren mit mindestens einer, zwei, drei oder vier Doppelbindungen in der Fettsäure desaturieren.

[0081] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform sind isolierte Nukleinsäuren, umfassend Nukleotidsequenzen, die für Polypeptide kodieren, die C_{18} - bzw. C_{20} -Fettsäuren mit mindestens ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen in der Fettsäure desaturieren und sind aus der Gruppe, bestehend aus

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

[0082] Die oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäure stammt von Organismen, wie Ciliaten, Pilzen, Algen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können, vorzugsweise von *Phaeodactylum tricornutum* oder nah verwandten Organismen.

[0083] Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die Desaturase-Polypeptide oder biologisch aktive Teile davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung einer Desaturase-kodierenden Nukleinsäure (z. B. Desaturase-DNA) ausreichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, soll DNA-Moleküle (z. B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z. B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, umfassen. Dieser Begriff umfasst zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäure-

remolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z. B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte Desaturase-Nukleinsäuremolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (z. B. eine *Physcomitrella patens*-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

[0084] Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, z. B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Beispielsweise kann aus einer *Phaeodactylum tricornutum* cDNA aus einer *Phaeodactylum tricornutum*-Bank isoliert werden, indem die vollständige SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder ein Teil davon als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z. B. beschrieben in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, insbesondere Regionen um Motive aus Beispiel 5a erstellt werden oder Modifikationen ebensolcher in einzelnen definierten Aminosäuren, verwendet werden (z. B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z. B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294–5299) und cDNA mittels Reverse Transkriptase (z. B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL.) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 sowie der in Fig. 5a gezeigten Sequenzen oder mithilfe der in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

[0085] Die in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigte cDNA umfasst Sequenzen, die Desaturasen kodieren, (d. h. den "kodierenden Bereich") sowie 5'-untranslatierte Sequenzen und 3'-untranslatierte Sequenzen. Alternativ kann das Nukleinsäuremolekül nur den kodierenden Bereich einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 umfassen oder kann ganze genomische Fragmente, die aus genomischer DNA isoliert sind, enthalten.

[0086] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül, das ein Komplement einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder eines Teils davon ist. Ein Nukleinsäuremolekül, das zu einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen komplementär ist, ist dann ausreichend komplementär, wenn es mit einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

[0087] Homologe der neuen Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 bis 60%, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80%, 80 bis 90% oder 90 bis 95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein isoliertes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisiert, z. B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10%, vorzugsweise 20%, besonders bevorzugt 30%, ganz besonders bevorzugt 40% der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 kodierten Protein.

[0088] Homologen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

[0089] Homologen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

[0090] Überdies kann das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül nur einen Teil des kodierenden Bereichs einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 umfassen, zum Beispiel ein Fragment, das als Sonde oder Primer verwendet werden kann, oder ein Fragment, welches einen biologisch aktiven Abschnitt einer Desaturase kodiert. Die aus der Klo-

nierung des Desaturase-Gens von *Phaeodactylum tricornutum* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von Desaturase-Homologen in anderen Zelltypen und Organismen sowie Desaturase-Homologen aus anderen Mikroalgen oder verwandten Arten gestaltet sind. Die Sonde/der Primer umfasst gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid umfasst gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 16, stärker bevorzugt etwa 25, 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen oder seiner Homologen, Derivate oder Analoga oder natürlich vorkommender Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von Desaturase-Homologen verwendet werden. Sonden auf der Basis der Desaturase-Nukleotidsequenzen können zum Nachweis von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe Proteine kodieren, verwendet werden. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, z. B. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines Test-Kits für genomische Marker zur Identifizierung von Zellen, die eine Desaturase misexprimieren, beispielsweise durch Messen einer Menge einer Desaturase-kodierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, z. B. Messen der Desaturase-mRNA-Spiegel, oder zur Bestimmung, ob ein genomisches Desaturase-Gen mutiert oder deletiert ist, verwendet werden.

[0091] Bei einer Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, das/der eine Aminosäuresequenz umfasst, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "ausreichend homolog" Proteine oder Teile davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste (z. B. einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette, wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 aufweisen, so dass das Protein oder der Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten oder Membrantransportsysteme können, wie hier beschrieben, eine Rolle bei der Produktion und Sekretion einer oder mehrerer Feinchemikalien spielen. Beispiele für diese Aktivitäten sind hier ebenfalls beschrieben. Somit trägt die "Funktion einer Desaturase" entweder direkt oder indirekt zur Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien bei. Beispiele für Desaturase-Substratspezifitäten der katalytischen Aktivität sind in Tabelle 5 und 6 angegeben.

[0092] Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls Proteine mit mindestens etwa 50 bis 60%, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70% und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80%, 80 bis 90%, 90 bis 95% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr Homologie zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2. Die Homologie der Aminosäuresequenz kann über den gesamten Sequenzbereich mit dem Programm PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351–360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5, 1989: 151–153) oder BESTFIT oder GAP bestimmt werden (Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915–10919).

[0093] Teile von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Teile einer der Desaturasen. Wie hier verwendet, soll der Begriff "biologisch aktiver Teil einer Desaturase" einen Abschnitt, z. B. eine Domäne/ein Motiv, einer Desaturase umfassen, der am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine in Tabelle 5 und 6 angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob eine Desaturase oder ein biologisch aktiver Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend in Beispiel 8 des Beispiels beschrieben, sind dem Fachmann geläufig.

[0094] Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte einer Desaturase kodieren, lassen sich durch Isolierung eines Teils einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11, Expressieren des kodierten Abschnitts der Desaturase oder des Peptids (z. B. durch rekombinante Expression in vitro) und Bestimmen der Aktivität des kodierten Teils der Desaturase oder des Peptids herstellen.

[0095] Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche Desaturase kodieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird. Bei einer anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit einer in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert. Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Vollängen-Desaturase-Protein, das zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 (die von einem in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten offenen Leseraster kodiert wird) im wesentlichen homolog ist und durch gängige Methoden identifizierbar und isolierbar ist.

[0096] Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Desaturase-Nukleotidsequenzen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der Desaturasen führen, innerhalb einer Population (z. B. der *Phaeodactylum tricornutum*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im Desaturase-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leseraster, der eine Desaturase, vorzugsweise eine *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase, kodiert. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5% in der Nukleotidsequenz des Desaturase-

Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der Desaturase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von Desaturasen nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

[0097] Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und nicht-*Phaeodactylum tricornutum*-Homologen, -Derivate und -Analoge der *Phaeodactylum tricornutum*-cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zu der hier offenbarten *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase-Nukleinsäure unter Verwendung der *Phaeodactylum tricornutum*-cDNA oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 umfasst.

[0098] Bei anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60% homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75% oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1–6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in $6 \times$ Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in $0,2 \times$ SSC, 0,1% SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis $5 \times$ SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50% Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA : DNA-Hybride zum Beispiel $0,1 \times$ SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA : RNA-Hybride zum Beispiel $0,1 \times$ SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50% in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

[0099] Vorzugsweise entspricht ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert, einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet, betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (z. B. ein natürliches Protein kodiert). Bei einer Ausführungsform kodiert die Nukleinsäure eine natürliche vorkommendes *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase.

[0100] Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der Desaturasesequenz, die in der Population existieren können, erkennt der Fachmann ferner, dass auch Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 eingebracht werden können, was zu Änderungen der Aminosäuresequenz der kodierten Desaturase führt, ohne dass die Funktionsfähigkeit des Desaturaseproteins beeinträchtigt wird. Beispielsweise lassen sich Nukleotidsubstitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 herstellen. Ein "nicht-essentieller" Aminosäurerest ist ein Rest, der sich in einer Wildtyp-Desaturasesequenz einer der Desaturasen (SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12) verändern lässt, ohne dass die Aktivität der Desaturase verändert oder wesentlich reduziert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die Desaturaseaktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste (z. B. diejenigen, die in der Domäne mit Desaturaseaktivität nicht konserviert oder lediglich semikonserviert sind) können jedoch für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit verändern, ohne dass die Desaturaseaktivität verändert wird.

[0101] Folglich betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die Desaturasen kodieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die Desaturaseaktivität nicht essentiell sind. Diese Desaturasen unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer Sequenz in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und behalten dennoch zumindest eine der hier beschriebenen Desaturaseaktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfasst bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 50% Homologie zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 umfasst und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein ist vorzugsweise mindestens etwa 50 bis 60% homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12, stärker bevorzugt mindestens etwa 60 bis 70% homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80%, 80 bis 90%, 90 bis 95% homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98% oder 99% homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12.

[0102] Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (z. B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und einer mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z. B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (z. B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO:

2, 4, 6 oder 12) durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz (z. B. einer mutierten Form der aus SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ausgewählten Sequenz) belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d. h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d. h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen \times 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen.

[0103] Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Desaturase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z. B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z. B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z. B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z. B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z. B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z. B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nichtessentieller Aminosäurerest in einer Desaturase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der Desaturase-kodierenden Sequenz eingebracht werden, z. B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen Desaturase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die Desaturaseaktivität beibehalten. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z. B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests (siehe Beispielteil) bestimmt werden.

[0104] Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, welche die vorstehend beschriebenen Desaturasen kodieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die "Antisense" zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen sind. Eine "Antisense"-Nukleinsäure umfasst eine Nukleotidsequenz, die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein kodiert, komplementär ist, z. B. komplementär zum kodierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die Antisense-Nukleinsäure kann zu einem gesamten Desaturase-kodierenden Strang oder nur zu einem Teil davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die eine Desaturase kodiert. Der Begriff "kodierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfasst, die in Aminosäurereste translatiert werden (z. B. den gesamten kodierenden Bereich, der mit dem Stopcodon beginnt und endet, d. h. dem letzten Codon vor dem Stopcodon). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "nicht-kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die Desaturase kodiert. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den kodierenden Bereich flankieren und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d. h. die man auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet).

[0105] Unter Voraussetzung der hier offenbarten Desaturase-kodierenden Sequenzen des kodierenden Stranges (z. B. die in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten Sequenzen) können erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuren gemäß den Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung gestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann komplementär zum gesamten kodierenden Bereich von Desaturase-mRNA sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das nur zu einem Teil des kodierenden oder nicht-kodierenden Bereichs von Desaturase-mRNA "Antisense" ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann z. B. zu dem Bereich, der die Translationsstartstelle von Desaturase-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann z. B. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 und mehr Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann unter Verwendung chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (z. B. ein Antisense-Oligonukleotid) kann z. B. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschiedentlich modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, dass sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen oder die physikalische Stabilität des zwischen der Antisense- und der Sense-Nukleinsäure gebildeten Duplexes erhöhen, beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele für modifizierte Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u. a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentyladenin, Uracil-5-oxysäure (v), Wybutoxin, Desaturaseudouracil, Queosin, 2-Thioctyosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxysäuremethyl-ester, Uracil-5-oxysäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann alternativ biologisch unter Verwendung eines Expressionsvektors hergestellt werden, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist (d. h. RNA, die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird, ist zu einer Zielnukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert,

was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).

[0106] Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so dass sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die eine Desaturase kodiert, hybridisieren oder daran binden, um dadurch die Expression des Proteins, z. B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, zu hemmen. Die Hybridisierung kann durch herkömmliche Nukleotidkomplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder z. B. im Fall eines Antisense-Nukleinsäuremoleküls, das DNA-Duplexes bindet, durch spezifische Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen. Das Antisense-Molekül kann so modifiziert sein, dass es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiertes Antigen bindet, z. B. durch Binden des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Antikörper, das/der an einen Zelloberflächenrezeptor oder ein Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren den Zellen zugeführt werden. Zur Erzielung ausreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken prokaryotischen, viralen oder eukaryotischen, einschließlich pflanzlichen, Promotors befindet, bevorzugt.

[0107] Bei einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomer Nukleinsäuremolekül. Ein α -anomer Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen (Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 6625–6641). Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-o-Methylribonukleotid (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 6131–6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215: 327–330) umfassen.

[0108] Bei einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme (z. B. Hammerhead-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334: 585–591)) zur katalytischen Spaltung von Desaturase-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation von Desaturase-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine Desaturase-kodierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 offenbarten Desaturase-cDNA, d. h. oder auf der Basis einer gemäß den in dieser Erfindung gelehnten Verfahren zu isolierenden heterologen Sequenz gestaltet werden. Beispielsweise kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zu der Nukleotidsequenz ist, die in einer Desaturase-kodierenden mRNA gespalten werden soll. Siehe z. B. Cech et al., US-Patent Nr. 4,987,071 und Cech et al., US-Patent Nr. 5,116,742. Alternativ kann Desaturase-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit einer spezifischen Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe z. B. Bartel, D., und Szostak, J. W. (1993) Science 261: 1411–1418.

[0109] Alternativ lässt sich die Desaturase-Gen-Expression hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer Desaturase-Nukleotidsequenz (z. B. einem Desaturase-Promotor und/oder -Enhancer) sind, so dirigiert werden, dass Dreifachhelix-Strukturen gebildet werden, welche die Transkription eines Desaturase-Gens in Zielzellen hemmen. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569–84; Helene, C., et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27–36; und Maher, L. J. (1992) Bioassays 14(12): 807–815.

B. Genkonstrukt (= Nukleinsäurekonstrukt, -fragment oder Expressionskassette)

[0110] Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette sind die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche vorteilhaft die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Δ -5-Desaturase-/ Δ -6-Desaturase und/oder Δ -12-Desaturasegene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.

[0111] Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

[0112] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Se-

quenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 definiert sind und gem. SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 oder 12 Polypeptide kodieren. Dabei stammen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 und 11 von Desaturasen, während SEQ ID NO: 9 für eine Elongase codiert. Desaturasen codierende Enzyme, die eine Doppelbindung in Δ -5-, Δ -6- oder Δ -12-Position einführen, wobei das Substrat ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen aufweisen. Die in SEQ ID NO: 9 dargestellte Sequenz codiert für eine Enzymaktivität, die eine Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert sowie ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind. Beispiele für diese Regulationssequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und, wenn geeignet, genetisch modifiziert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet worden ist und die Expression der Gene gesteigert worden ist.

[0113] Das Genkonstrukt kann jedoch auch eine einfachere Struktur haben, d. h. dass keine zusätzlichen Regulationssignale vor der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder ihren Homologen inseriert worden sind und der natürliche Promotor mit seiner Regulation nicht deletiert worden ist. Statt dessen ist die natürliche Regulationssequenz so mutiert worden, dass keine Regulation mehr stattfindet und die Genexpression verstärkt ist. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte Enhancer-Sequenzen, die funktionsfähig mit dem Promotor verbunden sind und die gesteigerte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen, umfassen. Es ist auch möglich, am 3'-Ende der DNA-Sequenzen zusätzlich vorteilhafte Sequenzen zu inserieren, beispielsweise weitere Regulationselemente oder Terminatoren. Die Desaturasegene und das Elongasegen können im Genkonstrukt in einer oder mehreren Kopien vorliegen. Sie können in einem Genkonstrukt oder mehreren Genkonstrukten vorliegen. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene in Organismen, wenn weitere Gene im Genkonstrukt vorliegen.

[0114] Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacI^q*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, λ -*P_R*- oder λ -*P_L*-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren *CaMV/35S* [Franck et al., Cell 21 (1980) 285–294], *PRP1* [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992: 397–404 (Gatz et al., Tetracyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisinäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der *ST-LSI*-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor der Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor, aber auch andere Promotoren wie der *LeB4*- (Baeumlein et al., Plant J., 1992, 2 (2): 233–239), *DC3*- (Thomas, Plant Cell 1996, 263: 359–368), Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arabidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bee4-Promotor aus Brassica), von Baeumlein et al., Plant J., 1992, 2 (2): 233–239 (*LeB4*-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen *lpt-2*- oder *lpt-1*-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

[0115] Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich synthetische Promotoren zu verwenden.

[0116] Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym, A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet.

[0117] Genkonstrukte umfassen vorteilhafterweise zur Expression der anderen vorliegenden Gene weitere 3'- und/oder 5'-terminale Regulationssequenzen zur Steigerung der Expression, die in Abhängigkeit vom gewählten Wirtsorganismus und dem Gen oder den Genen für die optimale Expression ausgewählt werden. Diese Regulationssequenzen sollen, wie oben erwähnt, die spezifische Expression der Gene und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann je nach dem Wirtsorganismus beispielsweise bedeuten, dass das Gen nur nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

[0118] Die Regulationssequenzen oder -faktoren können außerdem vorzugsweise eine vorteilhafte Wirkung auf die

Expression der eingebrachten Gene haben und diese somit steigern. Auf diese Weise ist es möglich, dass die Regulationselemente unter Verwendung starker Transkriptionssignale, wie Promotoren und/oder Enhancer, vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene verstärkt werden. Es ist jedoch weiterhin auch möglich, die Translation zum Beispiel durch Verbesserung der mRNA-Stabilität zu verstärken.

5

C. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

[0119] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die eine Desaturase allein (oder einen Teil davon) oder ein unter Punkt b beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in dem die erfindungsgemäße Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie Desaturasen oder Elongasen enthalten ist. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z. B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z. B. nicht-episomale Säugervektoren) werden beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (z. B. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

[0120] Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z. B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z. B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z. B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89–108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in Wirtszellen eingebracht werden, um dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, herzustellen, die von den Nukleinsäuren, wie hier beschrieben, kodiert werden (z. B. Desaturasen, mutante Formen von Desaturasen, Fusionsproteine usw.).

[0121] Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von Desaturasen und Elongasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Beispielsweise können Desaturasegene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M. A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423–488; von den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J. W. Bennet & L. L. Lasure, Hrsgb., S. 396–428; Academic Press: San Diego; und von den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J. F., et al., Hrsgb., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falcioratore et al., 1999, *Marine Biotechnology*, 1, 3: 239–251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucocystis, Platyophrya, Potomacusa, Desaturaseudocohnilembus, Euplotes, Engelmanniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*: 583–586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S. 71–119 (1993); F. F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205–225 (und darin zitierte Literaturstellen)) oder Säugerkzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

[0122] Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Pro-

motoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren fügen eine Reihe von Aminosäuren an ein darin kodiertes Protein an, gewöhnlich am Aminoterminus des rekombinanten Proteins, aber auch am C-Terminus oder fusioniert innerhalb geeigneter Bereiche in den Proteinen. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so dass die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

[0123] Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u. a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B., und Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67: 31–40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die Desaturase-kodierende Sequenz in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so dass ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein kodiert, das vom N-Terminus zum C-Terminus GST-Thrombin-Spaltstelle-X-Protein umfasst. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Rekombinante Desaturase, die nicht an GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.

[0124] Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u. a. pTrc (Amann et al. (1988) *Gene* 69: 301–315) und pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60–89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

[0125] Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667. Eine Strategie zur Maximierung der Expression von rekombinantem Protein ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119–128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure, so dass die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie C. glutamicum, verwendet werden (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 2111–2118). Diese Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

[0126] Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Desaturase-Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturase1 (Baldari et al. (1987) *Embo J.* 6: 229–234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30: 933–943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54: 113–123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: von den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of fungi*, J. F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: *More Gene Manipulations in Fungi* [J. W. Bennet & L. L. Lasure, Hrsgb., S. 396–428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEpl6, YEpl3 oder pEMBLYe23.

[0127] Alternativ können die erfindungsgemäßen Desaturasen in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z. B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.*, 3: 2156–2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170: 31–39).

[0128] Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: *Cloning Vectors* (Hrsgb. Pouwels, P. H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0-444-904018).

[0129] Bei noch einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Säugerzellen unter Verwendung eines Säuger-Expressionsvektors exprimiert. Unter Säugern werden im Sinne der Erfindung alle nicht-humanen Säuger verstanden. Beispiele für Säuger-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329: 840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187–195). Bei der Verwendung in Säugerzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen Regulationselementen bereitgestellt. Üblicherweise verwendete Promotoren stammen z. B. aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

[0130] Bei einer anderen Ausführungsform kann der rekombinante Säuger-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in einem bestimmten Zelltyp steuern (z. B. werden gewebespezifische Regulationselemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet). Gewebespezifische Regulationselemente sind im Fachgebiet bekannt. Nicht beschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren sind u. a. der Albuminpromotor (leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268–277), lymphoidspezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235–275), insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:

729–733) und Immunglobulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33: 729–740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33: 741–748), neuronspezifische Promotoren (z. B. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddle (1989) PNAS 86: 5473–5477), pankreasspezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science 230: 912–916) und milchdrüsenspezifische Promotoren (z. B. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4,873,316 und Europäische Patentanmeldung-Veröffentlichung Nr. 264,166). Auch entwicklungsregulierte Promotoren sind umfasst, z. B. die hox-Promotoren der Maus (Kessel und Gruss (1990) Science 249: 374–379) und der Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537–546).

[0131] Bei einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3): 239–251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z. B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195–1197; und Bevan, M. W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12: 8711–8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38.

[0132] Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agrobacterium tumefaciens-t-DNA stammen, wie das als Octopinsynthese bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

[0133] Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15: 8693–8711).

[0134] Die Pflanzengenexpression muss funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Bevorzugt sind Promotoren, welche die konstitutive Expression herbeiführen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195–2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285–294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

[0135] Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285–423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

[0136] Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 89–108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397–404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

[0137] Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361–366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alphaamylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

[0138] Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napiingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459–67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233–9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

[0139] Insbesondere kann die multiparallele Expression von erfindungsgemäßen Desaturasen allein oder in Kombination mit anderen desaturasen oder Elongasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Exopressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

[0140] Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in WO 99/46394.

[0141] Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. D. h. das DNA-Molekül ist derart mit einer regulatorischen Sequenz funktionsfähig verbunden, dass die Expression (durch Transkription des DNA-Moleküls)

eines RNA-Moleküls, das zur Desaturase-mRNA "Antisense" ist, ermöglicht wird. Es können Regulationssequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig mit einer in Antisense-Richtung klonierten Nukleinsäure verbunden sind und die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, zum Beispiel können virale Promotoren und/oder Enhancer oder Regulationssequenzen ausgewählt werden, welche die konstitutive, gewebe-spezifische oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids, Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt werden kann, in den der Vektor eingebracht worden ist. Eine Erläuterung der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen siehe in Weintraub, H., et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetia analysis, Reviews – Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

[0142] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Selbstverständlich betreffen diese Begriffe nicht nur die bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Zelle. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch immer noch vom Umfang des Begriffs, wie hier verwendet, umfasst.

[0143] Unter Rekombinant oder Transgen beispielsweise rekombinanten Expressionsvektor oder rekombinanten Wirt oder Wirtszellen im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder deren natürliche Regulationssequenzen an 5' und 3'-Position der Nukleinsäuren nicht in ihrer natürlichen Umgebung sind, das heißt entweder wurde die Lage der Sequenzen im Herkunftsorganismus verändert oder in diesem wurden die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Regulationssequenzen mutiert oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen wurden in einen anderen Organismus als den Herkunftsorganismus verbracht oder deren Regulationssequenzen. Auch Kombinationen dieser Veränderungen sind möglich. Unter natürlicher Umgebung ist die Lage einer Nukleinsäuresequenz in einem Organismus zu verstehen, wie er in der Natur vorkommt.

[0144] Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Zum Beispiel kann eine Desaturase in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Pilzzellen oder Säugerzellen (wie Chinesischer Hamster-Ovarzellen (CHO) oder COS-Zellen), Algen, Ciliaten, Pflanzenzellen, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

[0145] Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z. B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Coprazipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

[0146] Über die stabile Transfektion von Säugerzellen ist bekannt, dass je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr Genom integriert. Zur Identifikation und Selektion dieser Integrierten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z. B. Resistenz gegen Antibiotika) kodiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, welche Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen, oder in Pflanzen solche, welche Resistenz gegen ein Herbizid, wie Glyphosphat oder Glufosinat, verleihen. Weitere geeignete Marker sind beispielsweise Marker, welche Gene kodieren, die an Biosynthesewegen von zum Beispiel Zuckern oder Aminosäuren beteiligt sind, wie β -Galactosidase, *ura3* oder *ilv2*. Marker, welche Gene, wie Luziferase, *gfp* oder andere Fluoreszenzgene kodieren, sind ebenfalls geeignet. Diese Marker lassen sich in Mutanten verwenden, in denen diese Gene nicht funktionell sind, da sie beispielsweise mittels herkömmlicher Verfahren deletiert worden sind. Ferner können Marker, welche eine Nukleinsäure kodieren, die einen selektierbaren Marker kodiert, in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der eine Desaturase kodiert, oder können auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können zum Beispiel durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z. B. überleben Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, wohingegen die anderen Zellen absterben).

[0147] Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines Desaturasegens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um dadurch das Desaturasegen zu verändern, z. B. funktionell zu disruptieren. Dieses Desaturasegen ist vorzugsweise ein *Phaeodactylum tricornutum* Desaturasegen, es kann jedoch ein Homologon oder Analogon aus anderen Organismen, sogar aus einer Säuger-, Pilz- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor so gestaltet, dass das endogene Desaturasegen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert wird (d. h. nicht länger ein funktionelles Protein kodiert, auch als Knockout-Vektor bezeichnet). Alternativ kann der Vektor so gestaltet sein, dass das endogene Desaturasegen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert wird, aber immer noch ein funktionelles Protein kodiert (z. B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich so verändert sein, dass dadurch die Expression der endogenen Desaturase verändert wird). Zur Erzeugung einer Punktmutation über homologe Rekombination können auch als Chimeraplasty bekannte DNA-RNA-Hybride verwendet werden, die aus Cole-Strauss et al., 1999, Nucleic Acids Research 27(5): 1323–1330 und Kmiec, Gene therapy, 1999, American Scientist, 87(3): 240–247 bekannt sind.

[0148] Im Vektor für die homologe Rekombination ist der veränderte Abschnitt des Desaturasegens an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des Desaturasegens flankiert, so dass homologe Rekombination zwischen dem

exogenen Desaturasegen, das auf dem Vektor vorliegt, und einem endogenen Desaturasegen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanze möglich ist. Die zusätzliche flankierende Desaturase-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich sind im Vektor mehrere hundert Basenpaare bis zu Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) enthalten (eine Beschreibung von Vektoren zur homologen Rekombination siehe z. B. in Thomas, K. R., und Capecchi, M. R. (1987) Cell 51: 503 oder der Rekombination in *Physcomitrella patens* auf cDNA-Basis in Strepp et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (8): 4368–4373). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus oder eine Pflanzenzelle (z. B. mittels Polyethylenglycol-vermittelter DNA) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte Desaturasegen mit dem endogenen Desaturasegen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Techniken selektiert.

[0149] Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Organismen, wie Mikroorganismen, hergestellt werden, die ausgewählte Systeme enthalten, welche eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluß eines Desaturasegens in einem Vektor, wobei es unter die Kontrolle des lac-Operons gebracht wird, ermöglicht z. B. die Expression des Desaturasegens nur in Gegenwart von IPTG. Diese Regulationssysteme sind im Fachgebiet bekannt.

[0150] Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, in Kultur oder auf einem Feld wachsend, kann zur Produktion (d. h. Expression) einer Desaturase verwendet werden. In Pflanzen kann zusätzlich ein alternatives Verfahren durch direkten Transfer von DNA in sich entwickelnde Blüten über Elektroporation oder Gentransfer mittels *Agrobacterium* angewendet werden. Die Erfindung stellt folglich ferner Verfahren zur Produktion von Desaturasen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer Ausführungsform umfasst das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Desaturase kodiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das eine Wildtyp- oder veränderte Desaturase kodiert) in einem geeigneten Medium, bis die Desaturase produziert worden ist. Das Verfahren umfasst bei einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der Desaturasen aus dem Medium oder der Wirtszelle.

[0151] Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Organismen, wie Bakterien, Pilze, Hefen, Tier- oder Pflanzenzellen. Weitere vorteilhafte Organismen sind Tiere oder vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pilze oder Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Canola, Erdnuss, Lein, Soja, Safflor, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuß) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuß).

D. Isolierte Desaturase

[0152] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Desaturasen und biologisch aktive Teile davon. Ein "isoliertes" oder "gereinigtes" Protein oder ein biologisch aktiver Teil davon ist im wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im wesentlichen frei von zellulärem Material" umfasst Desaturase-Präparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombinant produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfasst der Ausdruck "im wesentlichen frei von zellulärem Material" Desaturase-Präparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen auf das Trockengewicht) nicht-Desaturase (hier auch als "verunreinigendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20% nicht-Desaturase, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% nicht-Desaturase und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% nicht-Desaturase. Wenn die Desaturase oder ein biologisch aktiver Teil davon rekombinant hergestellt worden ist, ist sie/er auch im wesentlichen frei von Kulturmedium, d. h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20%, stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" umfasst Desaturase-Präparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfasst der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" Desaturase-Präparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen auf das Trockengewicht) chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien, stärker bevorzugt weniger als etwa 20% chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien. Bei bevorzugten Ausführungsformen weisen isolierte Proteine oder biologisch aktive Teile davon keine verunreinigenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem die Desaturase stammt. Diese Proteine werden gewöhnlich durch rekombinante Expression zum Beispiel *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase in Pflanzen wie *Physcomitrella patens* bzw. o. g. oder Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *C. glutamicum*, Pilzen, wie *Mortierella*, Hefe, wie *Saccharomyces*, oder Ciliaten wie *Colpidium* oder Algen wie *Phaeodactylum* hergestellt.

[0153] Eine erfindungsgemäße isolierte Desaturase oder ein Teil davon kann auch am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Der Teil des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Teil, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten

- Ausführungsform hat eine erfindungsgemäße Desaturase eine der in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 gezeigten Aminosäuresequenzen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert. Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die mindestens etwa 50 bis 60%, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80%, 80 bis 90%, 90 bis 95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 18 ist. Die erfindungsgemäße bevorzugte Desaturase besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen Desaturase-Aktivitäten. Zum Beispiel umfasst eine erfindungsgemäße bevorzugte Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine Doppelbindung in eine Fettsäure mit ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen und einer Kettenlänge von C₁₈, C₂₀ oder C₂₂ einführt.
- [0154]** Bei anderen Ausführungsformen ist die Desaturase im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 und behält die funktionelle Aktivität des Proteins einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 bei, ihre Aminosäuresequenz unterscheidet sich jedoch aufgrund von natürlicher Variation oder Mutagenese, wie eingehend im obigen Unterabschnitt I beschrieben. Bei einer weiteren Ausführungsform ist die Desaturase folglich ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens etwa 50 bis 60%, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70% und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80%, 80 bis 90%, 90 bis 95% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 ist und zumindest eine der hier beschriebenen Desaturase-Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein vollständiges *Phaeodactylum tricornutum*-Protein, das im wesentlichen homolog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 ist.
- [0155]** Biologisch aktive Teile einer Desaturase umfassen Peptide, umfassend Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz einer Desaturase hergeleitet sind, z. B. eine in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einer Desaturase homolog ist, welche weniger Aminosäuren als die Vollängen-Desaturase oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einer Desaturase homolog ist, und zumindest eine Aktivität einer Desaturase aufweisen.
- [0156]** Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Teile (Peptide, z. B. Peptide, die zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität einer Desaturase. Überdies können andere biologisch aktive Teile, in denen andere Bereiche des Proteins deletiert sind, durch rekombinante Techniken hergestellt und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Teile einer Desaturase umfassen vorzugsweise ein/eine oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Teile davon mit biologischer Aktivität.
- [0157]** Desaturasen werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel wird ein das Protein kodierendes Nukleinsäuremolekül in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und die Desaturase wird in der Wirtszelle exprimiert. Die Desaturase kann dann durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Proteinreinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann eine Desaturase, ein -Polypeptid, oder -Peptid mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann native Desaturase aus Zellen (z. B. Endothelzellen) z. B. unter Verwendung eines Anti-Desaturase-Antikörpers isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei eine erfindungsgemäße Desaturase oder ein Fragment davon verwendet wird.
- [0158]** Die Erfindung stellt auch chimäre Desaturase-Proteine oder Desaturase-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfasst ein "chimäres Desaturase-Protein" oder "Desaturase-Fusionsprotein" ein Desaturase-Polypeptid, das funktionsfähig an ein nicht-Desaturase-Polypeptid gebunden ist. Ein "Desaturase-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die einer Desaturase entspricht, wohingegen ein "nicht-Desaturase-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im wesentlichen nicht homolog zu der Desaturase ist, z. B. ein Protein, das sich vom der Desaturase unterscheidet und aus dem gleichen oder einem anderen Organismus stammt. Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, dass das Desaturase-Polypeptid und das nicht-Desaturase-Polypeptid so miteinander fusioniert sind, dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der verwendeten Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen. Das nicht-Desaturase-Polypeptid kann an den N-Terminus oder den C-Terminus des Desaturase-Polypeptids fusioniert sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein zum Beispiel ein GST-Desaturase-Fusionsprotein, bei dem die Desaturase-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenzen fusioniert sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung der rekombinanten Desaturasen erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein eine Desaturase, die eine heterologe Signalsequenz an ihrem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z. B. Säuger-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion einer Desaturase durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.
- [0159]** Ein erfindungsgemäßes chimäres Desaturase-Protein oder Desaturase-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel werden DNA-Fragmente, die unterschiedliche Polypeptidsequenzen kodieren, gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, indem beispielsweise glatte oder überhängende Enden zur Ligation, Restriktionsenzymspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden, wie erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu vermeiden, und enzymatische Ligation eingesetzt werden. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine PCR-Amplifizierung von Genfragmenten unter Verwendung von Ankerprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen, die anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden.

den können, so dass eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (siehe zum Beispiel Current Protocols in Molecular Biology, Hrsgb. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die bereits eine Fusionseinheit (z. B. ein GST-Polypeptid) kodieren. Eine Desaturase-kodierende Nukleinsäure kann in einen solchen Expressionsvektor kloniert werden, so dass die Fusionseinheit im Leseraster mit dem Desaturase-Protein verbunden ist.

[0160] Homologe der Desaturase können durch Mutagenese, z. B. durch spezifische Punktmutation oder Verkürzung der Desaturase, erzeugt werden. Der Begriff "Homologe", wie hier verwendet, betrifft eine variante Form der Desaturase, die als Agonist oder Antagonist der Desaturase-Aktivität wirkt. Ein Agonist der Desaturase kann im wesentlichen die gleiche Aktivität wie die oder einen Teil der biologischen Aktivitäten der Desaturase beibehalten. Ein Antagonist der Desaturase kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form der Desaturase durch zum Beispiel kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element der Stoffwechselkaskade für Zellmembrankomponenten, welche die Desaturase umfasst, oder durch Bindung an eine Desaturase, welche den Transport von Verbindungen über Zellmembranen vermittelt, hemmen, wodurch die Translokation gehemmt wird.

[0161] Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologe der Desaturase durch Sichten kombinatorischer Banken von Mutanten, z. B. Verkürzungsmutanten, der Desaturase hinsichtlich Desaturase-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Ausführungsform wird eine variierte Bank von Desaturase-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt und durch eine variierte Genbank kodiert. Eine variierte Bank von Desaturase-Varianten kann z. B. durch enzymatische Ligation eines Gemisches von synthetischen Oligonukleotiden in Gensequenzen hergestellt werden, so dass sich ein degenerierter Satz potentieller Desaturase-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer Fusionsproteine (z. B. für das Phage-Display), die diesen Satz von Desaturase-Sequenzen enthalten, exprimieren lässt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Desaturase-Homologen aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt und das synthetische Gen dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Satzes von Genen ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen, die den gewünschten Satz an potentiellen Desaturase-Sequenzen kodieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (siehe z. B. Narang, S. A. (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al., (1984) Science 198: 1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11: 477).

[0162] Zusätzlich können Banken von Desaturase-Fragmenten zur Herstellung einer variierten Population von Desaturase-Fragmenten für das Sichten und für die anschließende Selektion von Homologen einer Desaturase verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von Fragmenten der kodierenden Sequenz durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden Desaturase-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen Doppelstrangbrüche nur etwa einmal pro Molekül erfolgen, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, welche Sense/Antisense-Paare von verschiedenen Produkten mit Doppelstrangbrüchen umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Mit diesem Verfahren kann eine Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente der Desaturase verschiedener Größen kodiert.

[0163] Im Fachgebiet sind mehrere Techniken für das Sichten von Genprodukten in kombinatorischen Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und für das Sichten von cDNA-Banken nach Genprodukten mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Sichtung der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von Desaturase-Homologen erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Sichtung großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterworfen werden können, umfassen gewöhnlich das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren von geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen kodiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken erhöht, kann in Kombination mit den Sichtungstests zur Identifikation von Desaturase-Homologen verwendet werden (Arkin und Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331).

[0164] Eine weitere bekannte Technik zur Veränderung von katalytischen Eigenschaften von Enzymen bzw. deren codierenden Genen ist das "Gen-Shuffling" (siehe z. B. in Stemmer, PNAS 1994, 91: 10747-10751, WO 9720078 oder WO 9813487), das eine Kombination von Genfragmenten darstellt, wobei diese Neukombination zusätzlich noch durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktionen variiert werden kann und somit eine hohe zu testende Sequenzdiversität schafft. Voraussetzung für den Einsatz eines solchen Ansatzes ist jedoch ein geeignetes Screeningsystem, um die erstellte Gendiversität auf Funktionalität zu überprüfen.

[0165] Insbesondere für die Sichtung von Desaturaseaktivitäten ist ein Sichtungsverfahren Voraussetzung, das PUFA-abhängig Enzymaktivität(en) erfasst. Bzgl. Desaturaseaktivitäten mit Spezifität für PUFAs kann man in Mucor-Species, die durch bekannte Transformationsverfahren mit gewünschten Genkonstrukten transformierbar sind, die Toxizität von Arachidonsäure in Anwesenheit eines toxischen Metaboliten (hier: Salicylsäure oder Salicylsäurederivate) nutzen (Eroschin et al., Mikrobiologiya, Vol. 65, No. 1, 1996, Seiten 31-36), um eine wachstumsbasierte Erstsichtung durchzuführen. Resultierende Klone können dann einer Analyse ihrer Lipidinhaltstoffe mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie unterzogen werden, um Edukte und Produkte in Art und Menge zu erfassen.

[0166] Bei einer weiteren Ausführungsform können Tests auf Zellbasis zur Analyse einer variierten Desaturase-Bank unter Verwendung von weiteren im Fachgebiet bekannten Verfahren ausgenutzt werden.

[0167] Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Proteinhomologen, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen können bei einem oder mehreren der nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von Phaeodactylum und verwandten Organismen, Kartierung der Genome von Organismen, die mit Phaeodactylum tricornutum verwandt sind, Identifikation und Lokalisierung von Phaeodactylum tricornutum-Sequenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von Desaturase-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation einer Desaturase-Aktivität; Modulation des Stoffwechsels einer oder mehrerer Zellmembrankomponenten; Modulation des Transmembrantransports einer oder mehrerer Verbindungen sowie Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als Phaeodactylum tricornutum oder als naher Verwandter davon verwendet werden. Sie können auch zur Identifikation des Vorliegens von Phaeodactylum tricornutum oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von Phaeodactylum tricornutum-Genen bereit; durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheitlichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines Phaeodactylum tricornutum-Gens oder von Teilen davon überspannt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus vorliegt. Phaeodactylum tricornutum selbst werden zur kommerziellen Produktion mehrfach ungesättigter Säuren verwendet und eignen sich darüber hinaus zur PUFA-Produktion auch in anderen Organismen, insbesondere wenn erreicht werden soll, dass resultierende PUFAs auch in die Triacylglycerolfraktion eingebaut werden sollen.

[0168] Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Dies ist nicht nur zur Kartierung des Genoms, sondern auch für funktionelle Phaeodactylum tricornutum-Proteinen geeignet. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes DNA-bindendes Protein von Phaeodactylum tricornutum bindet, könnte das Phaeodactylum tricornutum-Genom zum Beispiel gespalten werden und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisierung des Fragments auf der Genomkarte von Phaeodactylum tricornutum und erleichtert, wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem ausreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, dass diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte bei verwandten Pilzen oder Algen dienen können.

[0169] Die erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle eignen sich auch für Evolutions- und Proteinstruktur-Untersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden von vielen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen genutzt; durch Vergleich der Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen kodieren, kann der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung, welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung von Bereichen des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteingenengineering-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, wieviel Mutagenese das Protein tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.

[0170] Die Manipulation der erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle kann zur Produktion von Desaturasen mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-Desaturasen führen. Die Effizienz oder Aktivität dieser Proteine kann verbessert sein, sie können in größeren Anzahlen als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder ihre Effizienz oder Aktivität kann verringert sein. Verbesserte Effizienz oder Aktivität bedeutet beispielsweise, dass das Enzym eine höhere Selektivität und/oder Aktivität, vorzugsweise eine mindestens 10% höhere, besonders bevorzugt eine mindestens 20% höhere Aktivität, ganz besonders bevorzugt eine mindestens 30% höhere Aktivität als das ursprüngliche Enzym aufweist.

[0171] Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen Desaturase die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie, welche ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Die Gewinnung von Feinchemikalien-Verbindungen aus Kulturen von Ciliaten, Algen oder Pilzen im großen Maßstab ist signifikant verbessert, wenn die Zelle die gewünschten Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen aus dem Kulturmedium (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse der gezüchteten Zellen) leicht gereinigt werden können. Ansonsten lässt sich die Reinigung verbessern, wenn die Zelle in vivo Verbindungen in einem spezialisierten Kompartiment mit einer Art Konzentrationsmechanismus speichert. Bei Pflanzen, die Desaturasen exprimieren, kann ein gesteigerter Transport zu besserer Verteilung innerhalb des Pflanzengewebes und der -organe führen. Durch Vergrößern der Anzahl oder der Aktivität von Transportermolekülen, welche Feinchemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch Ernte und Reinigung oder bei Pflanzen eine effizientere Verteilung erleichtert werden. Zur effizienten Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien sind dagegen erhöhte Mengen an Cofaktoren, Vorläufermolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d. h. Zuckern), Stickstoffquellen (d. h. Aminosäuren, Ammoniumsalzen), Phosphat und Schwefel, beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Beseitigung aller Einschränkungen des Nährstoffangebots beim Biosyntheseprozess verbessern. Fettsäuren, wie PUFAs, und Lipide, die PUFAs enthalten, sind selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Erhöhen der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man somit die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion

von Fettsäure- und Lipidmoleküle in Ciliaten, Algen, Pflanzen, Pilzen, Hefen oder anderen Mikroorganismen steigern.

[0172] Die Manipulation eines oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturase-Gene kann ebenfalls zu Desaturasen mit veränderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Algen, Pflanzen, Ciliaten oder Pilzen indirekt beeinflussen. Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse führen z. B. zur Produktion einer Vielzahl an Abfallprodukten (z. B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies), die diese Stoffwechselprozesse aktiv stören können (z. B. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten), wodurch einige Enzyme mit Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden (Groves, J. T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2); 226–235)). Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, aber die zur fermentativen Produktion im großen Maßstab verwendeten Zellen werden für die Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien optimiert und können somit mehr Abfallprodukte produzieren als für eine Wildtypzelle üblich. Durch Optimieren der Aktivität einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die am Export von Abfallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente Stoffwechselaktivität aufrechterhalten. Auch das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Feinchemikalie kann tatsächlich für die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern kann.

[0173] Die erfindungsgemäßen Desaturasen können ferner so manipuliert sein, dass die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine entscheidende Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was, wie vorstehend erläutert, den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import notwendiger Nährstoffe modifizieren kann. Diese Änderungen der Membranfluidität können auch die Integrität der Zelle entscheidend beeinflussen; Zellen mit vergleichsweise schwächeren Membranen sind anfälliger gegenüber abiotischen und biotischen Stressbedingungen, welche die Zelle beschädigen oder abtöten können. Durch Manipulieren von Desaturasen, die an der Produktion von Fettsäuren und Lipiden für den Membranaufbau beteiligt sind, so dass die resultierende Membran eine Membranzusammensetzung hat, die für die in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen empfänglicher sind, sollte ein größerer Anteil der Zellen überleben und sich vermehren. Größere Mengen an produzierenden Zellen sollten sich in größeren Ausbeuten, höherer Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur manifestieren.

[0174] Die vorstehend genannten Mutagenesestrategien für Desaturasen, die zu erhöhten Ausbeuten einer Feinchemikalie führen sollen, sollen nicht beschränkend sein; Variationen dieser Strategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Unter Verwendung dieser Mechanismen und mithilfe der hier offenbarten Mechanismen können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle zur Erzeugung von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwendet werden, die mutierte Desaturase-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Diese gewünschte Verbindung kann ein beliebiges natürliches Produkt von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder Bakterien sein, welches die Endprodukte von Biosynthesewegen und Zwischenprodukte natürlich vorkommen- der Stoffwechselwege umfasst, sowie Moleküle, die im Stoffwechsel dieser Zellen nicht natürlich vorkommen, die jedoch von den erfindungsgemäßen Zellen produziert werden.

[0175] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren zur Produktion von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor umfasst, welche ein Polypeptid kodieren, das C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen, unter denen PUFAs in dem Organismus produziert werden, verlängert, umfasst. Durch dieses Verfahren hergestellte PUFAs lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder von dem Feld, Aufbrechen und/oder Extrahieren des geernteten Materials mit einem organischen Lösungsmittel isolieren. Aus diesem Lösungsmittel kann das Öl, das Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs enthält, isoliert werden. Durch basische oder saure Hydrolyse der Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine können die freien Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs isoliert werden. Ein höherer Gehalt an PUFAs bedeutet mindestens 5%, vorzugsweise 10%, besonders bevorzugt 20%, ganz besonders bevorzugt 40% mehr PUFAs als der ursprüngliche Organismus, der keine zusätzliche Nukleinsäure, die die erfindungsgemäße Desaturase kodiert, besitzt.

[0176] Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, bei Kombination mit einer weiteren Elongasen und einer Δ-4-Desaturase fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

[0177] Eine erfindungsgemäße Ausführungsform sind Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

[0178] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

[0179] Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Identifikation eines Antagonisten oder Agonisten von Desaturasen, umfassend

- a) in Kontaktbringen der Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Kandidatenstoff;
- b) Testen der Desaturaseaktivität;
- c) Vergleichen der Desaturaseaktivität mit einer Standardaktivität in Abwesenheit des Kandidatenstoffs, wobei ein

Anstieg der Desaturaseaktivität über den Standard anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Agonist und ein Verringerung der Desaturaseaktivität anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Antagonist ist.

- [0180]** Der genannte Kandidatenstoff kann ein chemisch synthetisierter oder mikrobiologisch produzierter Stoff sein und z. B. in Zellextrakten von z. B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Weiterhin kann der genannte Stoff zwar im Stand der Technik bekannt sein, aber bisher nicht bekannt sein als die Aktivität der Desaturasen steigend oder reprimierend. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z. B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z. B. Kapitel 17. Die genannten Stoffe können z. B. zu dem Reaktionsgemisch oder dem Kulturmedium zugegeben werden oder den Zellen injiziert werden oder auf eine Pflanze gesprüht werden.
- [0181]** Wenn eine Probe, die ein nach der erfindungsgemäßen Methode aktiven Stoff beinhaltet, identifiziert wurde, dann ist es entweder möglich, den Stoff direkt von der ursprünglichen Probe zu isolieren oder man kann die Probe in verschiedene Gruppen teilen, z. B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Substanzen pro Probe zu reduzieren und dann das erfindungsgemäße Verfahren mit einer solchen "Untersuche" der ursprünglichen Probe zu wiederholen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Probe nur noch eine geringe Anzahl von Substanzen oder nur noch eine Substanz umfaßt. Vorzugsweise wird der gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Stoff oder Derivate davon weiter formuliert, so, daß er für die Anwendung in der Pflanzenzüchtung oder Pflanzenzell- oder Gewebekultur geeignet ist.
- [0182]** Die Stoffe, die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet und identifiziert wurden, können sein: Expressionsbibliotheken, z. B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879–880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237–245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193–198 und darin zitierte Referenzen). Diese Stoffe können auch funktionelle Derivate oder Analogon der bekannten Inhibitoren oder Aktivatoren sein. Verfahren zur Herstellung von chemischen Derivaten oder Analogon sind dem Fachmann bekannt. Die genannten Derivate und Analogon können gemäß Verfahren nach dem Stand der Technik getestet werden. Weiterhin kann computergestütztes Design oder Peptidomimetics zur Herstellung geeigneter Derivate und Analogon verwendet werden. Die Zelle oder das Gewebe, die/das für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden kann, ist vorzugsweise eine erfindungsgemäße Wirtszelle, Pflanzenzelle oder ein Pflanzengewebe, wie in den oben genannten Ausführungsformen beschrieben.
- [0183]** Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung auch einen Stoff, der gemäß den vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert wurde. Der Stoff ist z. B. ein Homolog der erfindungsgemäßen Desaturasen. Homologe der Desaturasen können durch Mutagenese, z. B. durch Punktmutation oder Deletion der Desaturasen, erzeugt werden. Hierin verwendet wird der Begriff "Homolog" als eine variante Form der Desaturasen, die als Agonist oder Antagonist für die Aktivität der Desaturasen wirkt. Ein Agonist kann die im wesentlichen gleiche oder einen Teil der biologischen Aktivität der Desaturasen haben. Ein Antagonist der Desaturasen kann eine oder mehr Aktivitäten der natürlich vorkommenden Formen der Desaturasen inhibieren, z. B. kompetitiv an ein Downstream oder Upstream gelegenes Mitglied der Fettsäuresynthese-Stoffwechselwege, die die Desaturasen einschließen, binden oder an Desaturasen binden und dabei die Aktivität reduzieren oder inhibieren.
- [0184]** Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Antikörper oder ein Fragment davon, wie sie hierin beschrieben werden, der die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasen inhibiert.
- [0185]** Bei einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Antikörper, der spezifisch den erfindungsgemäßen oben beschriebenen Agonisten oder Antagonisten erkennt bzw. bindet.
- [0186]** Ein weiterer Aspekt betrifft eine Zusammensetzung, die den Antikörper, den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Stopp oder das Antisense-Molekül umfaßt.
- [0187]** In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit, umfassend die erfindungsgemäße Nukleinsäure, das erfindungsgemäße Genkonstrukt, die erfindungsgemäße Aminosäuresequenz, das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül, den erfindungsgemäßen Antikörper und/oder Zusammensetzung, einen Antagonisten oder Agonisten, der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde, und/oder erfindungsgemäße Öle, Lipide und/oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon. Ebenso kann das Kit die erfindungsgemäßen Wirtszellen, Organismen, Pflanzen oder Teile davon, erntbare Teile der erfindungsgemäßen Pflanzen oder Vermehrungsmaterial oder aber auch den erfindungsgemäßen Antagonisten oder Agonisten umfassen. Die Komponenten des Kits der vorliegenden Erfindung können in geeigneten Containern, beispielsweise mit oder in Puffern oder anderen Lösungen verpackt sein. Ein oder mehr der genannten Komponenten können in ein und demselben Container verpackt sein. Zusätzlich oder alternativ können ein oder mehr der genannten Komponenten z. B. auf einer festen Oberfläche adsorbiert sein, z. B. Nitrozellulosefilter, Glasplatten, Chips, Nylonmembranen oder Mikrotiterplatten. Das Kit kann für jede der hierin beschriebenen Methoden und Ausführungsformen verwendet werden, z. B. für die Produktion von Wirtszellen, transgenen Pflanzen, zur Detektion von homologen Sequenzen, zur Identifikation von Antagonisten oder Agonisten usw. Weiterhin kann das Kit Anleitungen für die Verwendung des Kits für eine der genannten Anwendungen enthalten.
- [0188]** Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispielteil

Beispiel 1

Allgemeine Verfahren

5

a) Allgemeine Klonierungsverfahren

[0189] Klonierungsverfahren, wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli*- und Hefe-Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA, wurden durchgeführt wie beschrieben in Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) oder Kaiser, Michaelis und Mitchell (1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3). Die Transformation und Anzucht von Algen, wie *Chlorella* oder *Phaeodactylum* werden durchgeführt wie beschrieben von El-Sheekh (1999), *Biologia Plantarum* 42: 209–216; Apt et al. (1996) *Molecular and General Genetics* 252 (5): 872–9. 10 15

b) Chemikalien

[0190] Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, in p. A.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden unter Verwendung von reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Wasserreinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden bezogen von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Wenn nicht anders angegeben, wurden sie nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. 20 25

c) Zellmaterial

30

[0191] Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646-Stammes enthalten, der über die Algensammlung der University of Texas, Austin verfügbar ist.

[0192] *Phaeodactylum tricornutum* wurde bei 25°C mit einem Licht/Dunkel Rhythmus von 14 : 10 Stunden bei 22°C und 35 microEinstein (entspricht micromol Photonen pro Quadratmeter und Sekunde) in Glasröhren kultiviert, die von unten mit Luft begast wurden. 35

[0193] Als Kulturmedium für *Phaeodactylum tricornutum* wurde das f/2 Kulturmedium mit 10% organischen Medium nach Guillard, R. R. L. verwendet (1975; Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L. and Chanley, M. H. (Eds.) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, pp. 29–60):

Es enthält

40

995,5 ml Seewasser (artifiziert)

1 ml NaNO₃ (75 g/l), 1 ml NaH₂PO₄ (5 g/l), 1 ml Spurenelementelösung, 1 ml Tris/Cl pH 8,0, 0,5 ml f/2 Vitaminlösung

Spurenelementelösung: Na₂EDTA (4,36 g/l), FeCl₃ (3,15 g/l),

Primäre Spurenelemente: CuSO₄ (10 g/l), ZnSO₄ (22 g/l), CoCl₂ (10 g/l), MnCl₂ (18 g/l), NaMoO₄ (6,3 g/l)

f/2 Vitaminlösung: Biotin 10 mg/l, Thiamin 200 mg/l, Vit B12 0,1 mg/l

45

org-Medium: Na-Acetat (1 g/l), Glucose (6 g/l), Na-Succinat (3 g/l), Bacto-Trypton (4 g/l), Hefe-Extrakt (2 g/l).

Beispiel 2

Isolierung von Gesamt-DNA aus *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646 für Hybridisierungsexperimente

50

[0194] Die Einzelheiten der Isolierung von Gesamt-DNA betreffen die Aufarbeitung von Pflanzenmaterial mit einem Frischgewicht von einem Gramm.

[0195] CTAB-Puffer: 2% (Gew./Vol.) N-Acetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB); 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA. 55

[0196] N-Laurylsarkosin-Puffer: 10% (Gew./Vol.) N-Laurylsarkosin; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA.

[0197] *Phaeodactylum tricornutum*-Zellmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser verrieben, so dass ein feines Pulver erhalten wurde, und in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde dann mit einer Schicht von 1 ml Zersetzungspuffer (1 ml CTAB-Puffer, 100 ml N-Laurylsarkosin-Puffer, 20 ml β-Mercaptoethanol und 10 ml Proteinase K-Lösung, 10 mg/ml) überschichtet und eine Stunde unter kontinuierlichem Schütteln bei 60°C inkubiert. Das erhaltene Homogenat wurde in zwei Eppendorfgefäße (2 ml) aufgeteilt und zweimal durch Schütteln mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert. Zur Phasentrennung wurde eine Zentrifugation bei 8000 × g und RT (= Raumtemperatur = ~23°C) jeweils 15 min lang durchgeführt. Die DNA wurde dann 30 min unter Verwendung von eiskaltem Isopropanol bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wurde bei 10000 g 30 min bei 4°C sedimentiert und in 180 ml TE-Puffer (Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) resuspendiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA mit NaCl (1,2 M Endkonzentration) behandelt und erneut 30 min unter Verwendung des zweifachen Volumens an absolutem Ethanol bei -70°C gefällt. Nach einem Waschschritt mit 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in 50 ml H₂O + RNase (50 mg/ml Endkonzentration) 60 65

aufgenommen. Die DNA wurde über Nacht bei 4°C gelöst und die RNase-Spaltung wurde anschließend 1 Std. bei 37°C durchgeführt. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei 4°C.

Beispiel 3

5

Isolierung von Gesamt-RNA und poly(A)⁺-RNA aus Pflanzen und *Phaeodactylum tricornutum*

[0198] Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen wie Lein und Raps etc. erfolgt nach einer bei Logemann et al. beschriebenen Methode (1987, Anal. Biochem. 163, 21). Aus Moos kann die Gesamt-RNA *Protonema*-Gewebe nach dem GTC-Verfahren (Reski et al., 1994, Mol. Gen. Genet., 244: 352–359) gewonnen werden.

[0199] RNA Isolierung aus *Phaeodactylum tricornutum*:

Tiefgefrorene Algenproben (–70°C) wurden in einem eiskalten Mörser unter Flüssigstickstoff zu feinem Pulver zerrieben. 2 Volumen Homogenisationsmedium (12,024 g Sorbitol, 40,0 ml 1 M Tris-HCl, pH 9 (0,2 M); 12,0 ml 5 M NaCl (0,3 M), 8,0 ml 250 mM EDTA, 761,0 mg EGTA, 40,0 ml 10% SDS wurden auf 200 ml mit H₂O aufgefüllt und der pH auf 8,5 eingestellt) und 4 Volumen Phenol mit 0,2% Mercaptoethanol wurden bei 40 bis 50°C unter gutem Mischen zu gefrorenem Zellpulver gegeben. Danach wurden 2 Volumen Chloroform hinzugefügt und für 15 min kräftig gerührt. Es wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert und die wässrige Phase mit Phenol/Chloroform (2 Vol) und abschließend mit Chloroform extrahiert.

[0200] Das erhaltene Volumen der wässrigen Phase wurde mit 1/20 Vol 4 M Na-Acetat (pH 6) und 1 Vol Isopropanol (eiskalt) versetzt und die Nukleinsäuren bei –20°C über Nacht (= ÜN) gefällt. Anschließend wurde 30 min bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand abgesogen. Es folgte ein Waschschritt mit 70% EtOH und erneute Zentrifugation. Das Sediment wurde in Tris-Borat-Puffer (80 mM Tris-Borat-Puffer, 10 mM EDTA, pH 7,0) aufgenommen. Dann wurde der Überstand mit 1/3 Vol 8 M LiCl versetzt, gemischt und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Sediment in RNase-freiem Wasser gelöst.

[0201] Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA erfolgte unter Verwendung von Dyna Beads® (Dyna, Oslo, Finnland) nach den Anweisungen im Protokoll des Herstellers.

[0202] Nach der Bestimmung der RNA- oder poly(A)⁺-RNA-Konzentration wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumina 3 M Natriumacetat, pH 4,6, und 2 Volumina Ethanol gefällt und bei –70°C aufbewahrt.

[0203] Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt ((1986) Anal. Biochem. 152, 304).

Beispiel 4

35

Konstruktion der cDNA-Bank

[0204] Zur Konstruktion der cDNA-Bank aus *Phaeodactylum tricornutum* wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Roche, Mannheim, Deutschland) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI/XhoI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit XhoI nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

50

Beispiel 5

DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

[0205] cDNA-Banken, wie im Beispiel 4 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das Kettenterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Sequenzierung zufälliger, einzelner Klone wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massenexzision und Retransformation von DH10B auf Agarplatten durchgeführt (Einzelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten *E. coli*-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)) gezüchtet worden waren, an einem Qiagen-DNA-Präparations-Roboter (Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers präpariert. Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet:

5' –CAGGAAACAGCTATGACC–3'
5' –CTAAAGGGAACAAAAGCTG–3'
5' –TGTAACGACGGCCAGT–3'

65

[0206] Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepakets EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, prozessiert und annotiert. Durch Nutzung von Vergleichsalgorithmen und unter Verwendung der in SEQ ID NO: 8 dargestellten Suchsequenz wurde mithilfe des BLAST-Programms nach homologen Genen gesucht (Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389–3402). Zwei Sequenzen aus *Phaeodactylum tricornutum* mit Homologien zur Suchsequenz aus *Physcomitrella patens* wurden eingehender charakterisiert. 5

Beispiel 5a

Isolation von Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum* über Polymerase Kettenreaktion mithilfe degenerierter Oligonukleotide 10

[0207] Mithilfe von publizierten Desaturasen können Motive identifiziert werden, die für Δ -5- und Δ -6-Desaturasen typisch sind. Im folgenden sind Oligonukleotidsequenzen mit möglichen Variationen dargestellt. Unter der Oligonukleotidsequenz ist im Ein-Buchstabencode die Aminosäure dargestellt, von der die Basenkombination abgeleitet werden kann. Z. B. bedeutet A/G, daß an dieser Position bei der Synthese des Bausteins statistisch gleichverteilt entweder ein A oder ein G in das Oligonukleotid eingebaut wird, da das von der korrespondierenden Aminosäure abgeleitete Basentriplett entweder ein AAA oder ein AAG sein kann. Die DNA Sequenz kann auch ein Inosin (i) enthalten, wenn die Bestimmung einer Base an dieser Position aufgrund des genetischen Codes drei oder vier unterschiedliche Basen erlaubt. Folgende Sequenzen und Primer können verwendet werden: 15 20

5'-Vorwärts-Primer:

F1a:	TGG	TGG	AA	A/G	TGG	AAi	CA	T/C	AA	
F1b:	TGG	TGG	AA	A/G	TGG	ACi	CA	T/C	AA	
F1a:	W	W	K		W	N/T	H		K/N	
F1b:	W	W	K		W	K	H		K/N	
F2a:	Gi	TGG	AA	A/G	GAi	A/C	Ai	CA	T/C	AA
F2b:	Gi	TGG	AA	A/G	TTG	A/C	Ai	CA	T/C	AA
F2a:	G/W	W	K		E/D	K/Q/N	H		K/N	
F2b:	G/W	W	K		W	K/Q/N	H		K/N	
F3a:	T	A/T	i		TTG	AAi	A/C	A	A/G	C/A
F3b:	T	A/T	i		TTG	AAi	A/C	A	A/G	CAi
F3a:	W				W	K/N	H/N		R/Q	H
F3b:	Y				W	K/N	H/N		R/Q	H
F4a:		GTi	TGG	A	A/T	G/A	GA	A/G	CA	A/G
F4b:		GTi	TGG	A	A/T	G/A	A/T	A	T/C	CA
F4a:		V	W		K/M		E		Q	H
F4b:		V	W		K/M		N/Y		Q	H
F5a1:		CA	T/C	TA	T/C	TGG	AA	A/G	AA	T/C
F5a1:		CA	T/C	TA	T/C	TGG	AA	A/G	AA	T/C
F5a1:		H		Y		W	K		N	Q
F6a:	TTG	TTG	AAi		A/C	A	A/G	AA	i	CA
F6a:	W	W	K/N		H/N		K/N		H	K/N

3'- Reverse Primer

	R1b:	GG	A/G	AA	iAG	G/A	TG	G/A	TG	T/C	TC						
5	R1b:	GG	A/G	AA	iAA	G/A	TG	G/A	TG	T/C	TC						
	R1a:	P		F	L		H		H		E						
	R1b:	P		F	F		H		H		E						
10	R2a1:	AA		iAG	A/G	TG	A/G	TG	iA	C/T	iA/G	T/C	TG				
	R2a2:	AA	T/C	AA	A/G	TG	A/G	TG	iA	C/T	iA/G	T/C	TG				
	R2a1:	F		L		H		H	V/I		V/A		Q				
	R3a1:	AT	iTG		iGG	A/G	AA	iAA	A/G	TG	A/G	TG					
15	R3a2:	AT	A/G	TT	iGG	A/G	AA	iAA	A/G	TG	A/G	TG					
	R3a3:	AT	iTG		iGG	A/G	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG					
	R3a4:	AT	A/G	TT	iGG	A/G	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG					
20	R3a1:	I/M	H/Q		P		F		F		H		H				
	R3a2:	I/M	N		P		F		L		H		H				
	R4a1:			CT		iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG			
	R4a2:			GA		iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG			
25	R4a3:			GT		iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG			
	R4a1:	=	T/R/S		P		F		F/L		H		H				
	R5a1:	AA	iAA		A/G	TG	A/G	TG	T/C	TC		T/A/G	AT	T/C	TG		
	R5a2:	AA	iAG		A/G	TG	A/G	TG	T/C	TC		T/A/G	AT	T/C	TG		
30	R5a1:	F	F				H		H		E		I			Q	
	R5a2:	F	L				H		H		E		I			Q	
	R6a1:	T			iGG	iA	A/G		iAA	A/G	TG	A/G	TG		iAC		
35	R6a1:	T			iGG	iA	A/G		iAG	A/G	TG	A/G	TG		iAC		
	R6a1:	T/N			P	L			F/L		H		H		V		

[0208] Aufgrund verschiedener Variationsmöglichkeiten sind viele abgeleitete Oligonukleotide möglich, jedoch überraschenderweise wurde gefunden, dass dargestellte Oligonukleotide besonders zur Isolation von Desaturasen geeignet sein können.

[0209] Die Primer können in allen Kombinationen für Polymerase Kettenreaktionen eingesetzt werden. Mithilfe einzelner Kombinationen konnten Desaturase-Fragmente isoliert werden, wenn nachfolgende Bedingungen berücksichtigt wurden: Für PCR Reaktionen wurden jeweils 10 nMol Primer und 10 ng einer durch in vivo Excision gewonnenen Plasmidbank eingesetzt. Die Plasmidbank konnte nach Protokollen des Herstellers (Stratagene) aus der Phagenbank isoliert werden. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt von 35 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C. Dabei wurde die Anlagerungstemperatur nach dem ersten Schritt von 55°C schrittweise um je 3°C erniedrigt und nach dem fünften Zyklus eine Anlagerungstemperatur von 40°C beibehalten. Letztlich wurde ein Zyklus mit 10 min bei 720C durchgeführt und der Ansatz durch Kühlen auf 4°C beendet.

[0210] Die Primerkombination F6a und R4a2 sind im Text unterstrichen gekennzeichnet und konnten erfolgreich zur Isolierung eines Desaturasefragmentes genutzt werden. Das resultierende Fragment konnte durch Sequenzierung verifiziert werden und zeigte Homologien zu einer Desaturase mit der Genbank Accession Nr. T36617 aus *Streptomyces coelicolor*. Die Homologie wurde mithilfe des BLASTP Programmes erhalten. Der Vergleich ist in Fig. 4 dargestellt. Es ergaben sich Identitäten von 34% und eine Homologie von 43% zu Sequenz T36617. Das DNA-Fragment wurde gemäß Beispiel 7 in einem Hybridisierungsexperiment zur Isolierung eines Vollängengens nach Standardbedingungen erfindungsgemäß eingesetzt.

[0211] Die Codierregion einer so isolierten DNA-Sequenz wurde durch Übersetzung des genetischen Codes in eine Polypeptidsequenz erhalten. In SEQ ID NO: 3 ist eine 1434 Basenpaare lange Sequenz dargestellt, die durch beschriebenes Verfahren isoliert werden konnte. Die Sequenz besitzt ein Startcodon in Position 1 bis 3 und ein Stopcodon in Position 1432-1434 und konnte in ein 477 Aminosäuren langes Polypeptid übersetzt werden. Durch Vergleich mit einer in WO 98/46763 beschriebenen Gensequenz wurde gefunden, dass ein nicht identisches aber homologes Fragment aus *Phaeodactylum tricornutum* codierend für 87 Aminosäuren vorbeschrieben wurde. Jedoch offenbart WO 98/46763 weder eine vollständige, funktionell aktive Desaturase noch Positions- oder Substratspezifität. Dies wird auch dadurch deutlich, dass sowohl Homologien zur Δ-5-, als auch zur Δ-6-Desaturase aus *Mortierella alpina* berichtet werden, ohne eine genaue Funktion festzulegen. Die erfindungsgemäße Sequenz hingegen codiert für eine funktionell aktive Δ-6-Acyl Lipid Desaturase.

Identifizierung von DNA Sequenzen codierend für Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*

[0212] Die Vollständigsequenz der Δ -6-Acyl Lipid Desaturase Pp_des6 AJ222980 (NCBI Genbank Accession Nr.) aus dem Moos *Physcomitrella patens* (siehe auch Tabelle 1) sowie die Δ -12-acyl Lipid Desaturase Sequenz (Tabelle 1 siehe Ma_des12) aus *Mortierella alpina* AF110509 (AF110509 NCBI Genbank Accession Nr.) wurden für Sequenzvergleiche mithilfe des TBLASTN Suchalgorithmus eingesetzt.

[0213] Die EST-Sequenzen PT0010070010R, PT001072031R sowie PT001078032R wurden zunächst aufgrund schwacher Homologien mit den Suchsequenzen aus *Physcomitrella* und *Mortierella* unter weiteren Kandidatengen als Zielgen in Betracht gezogen. In Fig. 1 und in Fig. 2 sowie Fig. 2a ist das Ergebnis der zwei gefundenen est-Sequenzen dargestellt. Die gefundenen Sequenzen sind Teil der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aus SEQ ID NO: 1 (Genname: Pt_des5, eigene Datenbank Nr. der Erfinder PT001078032R), SEQ ID NO: 5 (Genname: Pt_des12, eigene Datenbank Nr. der Erfinder PT0010070010R) und SEQ ID NO: 11 (Genname: Pt_des12.2, eigene Datenbank des Erfinders PT001072031R). Buchstaben zeigen identische Aminosäuren an, während das Pluszeichen eine chemisch ähnliche Aminosäure bedeutet. Die Identitäten bzw. Homologien aller erfindungsgemäß gefundener Sequenzen gehen aus Tabelle 2 zusammenfassend hervor.

[0214] Desaturasen können Cytochrom b5 Domänen aufweisen, die auch in anderen nicht Desaturasen codierenden Genen vorkommen. Cytochrom b5 Domänen zeigen mithin hohe Homologien an, obwohl es sich um verschiedene Genfunktionen handelt. Desaturasen können schwach konservierter Bereiche lediglich als putative Kandidatengene identifiziert werden und müssen auf die Enzymaktivität und Positionsspezifität der enzymatischen Funktion hin geprüft werden. Beispielsweise zeigen auch verschiedene Hydroxylasen, Acetylasen und Epoxygenasen ähnlich wie Desaturasen Histidin-Box Motive, so dass eine konkrete Funktion experimentell nachgewiesen werden muß und zusätzlich die Verifizierung der Doppelbindung erst eine sichere Enzymaktivität und Positionsspezifität einer Desaturase ermöglicht. Überraschenderweise wurde gefunden, dass erfindungsgemäße Δ -6- und Δ -5-Desaturase besonders geeignete Substratspezifitäten aufweisen und besonders geeignet sind, um in Kombination mit einer Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella* zur Produktion von polyungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure genutzt werden können.

[0215] Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon PT001078032R ergab eine 1652 Basenpaare lange Sequenz. Die Sequenz codiert für ein Polypeptid von 469 Aminosäuren dargestellt in SEQ ID NO: 2. Diese wurde erhalten durch Übersetzung des genetischen Codes aus SEQ ID NO: 1 mit einem Startcodon in Basenpaarposition 115–117 und mit einem Stopcodon in Basenpaarposition 1522–1524. Der Klon beinhaltet ein vollständiges Desaturase-Polypeptid, wie aus dem Sequenzvergleich in Fig. 3 zu ersehen ist. Striche bedeuten identische Aminosäuren, während Doppelpunkte und Einzelpunkte chemisch austauschbare, d. h. chemisch äquivalente Aminosäuren darstellen. Der Vergleich wurde mit der BLOSUM62 Austauschmatrix für Aminosäuren nach Henikoff & Henikoff durchgeführt: ((1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915–10919). Verwendete Parameter: Gap Weight: 8; Average Match: 2,912, Length Weight: 2, Average Mismatch: –2,003.

[0216] In Fig. 6 und Fig. 7 ist der Vergleich der Ma_des12 Peptidsequenz mit den gefundenen Sequenzen dargestellt.

[0217] Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon PT0010070010R ergab eine in SEQ ID NO: 5 dargestellte 1651 Basenpaare lange Sequenz mit einem Startcodon in Position 67–69 und einem Stopcodon in Position 1552–1554. Die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz ist in SEQ ID NO: 6 dargestellt.

[0218] Die Sequenzierung des vollständigen identifizierten cDNA Fragmentes aus Klon PT0010072031R ergab eine in SEQ ID NO: 11 dargestellte 1526 Basenpaare lange Sequenz mit einem Startcodon in Position 92–94 und einem Stopcodon in Position 1400–1402. Die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz ist in SEQ ID NO: 12 dargestellt.

[0219] In Tabelle 2 sind die Identitäten und Homologien erfindungsgemäßer Desaturasen untereinander und mit der Desaturase aus *Physcomitrella patens* und *Mortierella alpina* dargestellt. Die Angaben wurden mithilfe des Programms Bestfit unter gegebenen Parametern wie unten definiert als Teilprogramm folgender Software erhalten: Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA). Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915–10919.

[0220] Weiterhin ist in Fig. 5 der Vergleich der Δ -6-acyl Lipid Desaturase aus *Physcomitrella patens* mit der Polypeptidsequenz des Klons Pt_des6 dargestellt.

Tabelle 2

Homologie / Identität in %	Suchsequenz Pp_des6	Suchsequenz Ma_des12
Pt_des5	34.92/26.37	n.d.
Pt_des6	50.69/41.06	n.d.
Pt_des12	n.d.	48.58/38.92
Pt_des12.2	n.d.	48.37/41.60

n.d. = nicht durchgeführt.

[0221] Mithilfe des Algorithmus TBLASTN 2.0.10: Altschul et al 1997, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389–3402 wurden über einen lokalen Datenbankvergleich Sequenzen mit höchster Sequenzhomologie bzw. Identität identifiziert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 2A dargestellt.

Tabelle 2A

Homologe mit den höchsten Sequenzhomologien bzw. Identitäten zu erfindungsgemäßen Polypeptidsequenzen aus SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12

Homologie / Identität(%)	Suchsequenz PT001070010R	Suchsequenz PT001072031R	Suchsequenz PT001078032R	Suchsequenz Pt_des6
L26296: Fad2 A. thaliana	50 % / 37 %	n.d.	n.d.	n.d.
U86072 Petro- selinum crispum Fad2	n.d.	51/40	n.d.	n.d.
AL358652 L. major putative desaturase	n.d.	n.d.	45/30	n.d.
AB020032 M. alpina delta 6 desaturase	n.d.	n.d.	n.d.	53/38

Beispiel 7

Identifikation von Genen mittels Hybridisierung

[0222] Gensequenzen lassen sich zur Identifikation homologer oder heterologer Gene aus cDNA- oder genomischen Banken verwenden.

[0223] Homologe Gene (d. h. Voll-Längen-cDNA-Klone, die homolog sind, oder Homologen) lassen sich über Nukleinsäurehybridisierung unter Verwendung von beispielsweise cDNA-Banken isolieren: Insbesondere zur Isolierung von funktionell aktiven Voll-Längengen der in SEQ ID NO: 3 gezeigten kann die Methode genutzt werden. Je nach der Häufigkeit des Gens von Interesse werden 100000 bis zu 1000000 rekombinante Bakteriophagen plattiert und auf eine Nylonmembran überführt. Nach der Denaturierung mit Alkali wurde die DNA auf der Membran z. B. durch UV-Vernetzung immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgt bei hoch-stringenten Bedingungen. In wässriger Lösung werden die Hybridisierung und die Waschschritte bei einer Ionenstärke von 1 M NaCl und einer Temperatur von 68°C durchgeführt. Hybridisierungs sonden wurden z. B. durch Markierung mittels radioaktiver (³²P-) Nicktranskription (High Prime, Roche, Mannheim, Deutschland) hergestellt. Die Signale werden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

[0224] Partiiell homologe oder heterologe Gene, die verwandt, aber nicht identisch sind, lassen sich analog zum oben beschriebenen Verfahren unter Verwendung niedrig-stringenter Hybridisierungs- und Waschbedingungen identifizieren. Für die wässrige Hybridisierung wurde die Ionenstärke gewöhnlich bei 1 M NaCl gehalten, wobei die Temperatur nach und nach von 68 auf 42°C gesenkt wurde.

[0225] Die Isolierung von Gensequenzen, die nur zu einer einzelnen Domäne von beispielsweise 10 bis 20 Aminosäuren Homologien aufweisen, lässt sich unter Verwendung synthetischer, radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden durchführen. Radioaktiv markierte Oligonukleotide werden mittels Phosphorylierung des 5'-Endes zweier komplementärer Oligonukleotide mit T4-Polynukleotidkinase hergestellt. Die komplementären Oligonukleotide werden aneinander hybridisiert und ligiert, so dass Konkatemere entstehen. Die doppelsträngigen Konkatemere werden beispielsweise durch Nicktranskription radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgt gewöhnlich bei niedrig-stringenten Bedingungen unter Verwendung hoher Oligonukleotidkonzentrationen.

[0226] Oligonukleotid-Hybridisierungslösung:

6 × SSC
0,01 M Natriumphosphat
1 mM EDTA (pH 8)
0,5% SDS
100 mikrog/ml denaturierte Lachssperma-DNA
0,1% fettarme Trockenmilch.

[0227] Während der Hybridisierung wird die Temperatur schrittweise auf 5 bis 10°C unter die berechnete Oligonukleotid-T_m oder bis auf Raumtemperatur (bedeutet RT = ~23°C in allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben) gesenkt, gefolgt von Waschschritten und Autoradiographie. Das Waschen wird mit extrem niedriger Stringenz durchgeführt, zum Beispiel 3 Waschschritte unter Verwendung von 4 × SSC. Weitere Einzelheiten sind wie von Sambrook, J., et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F. M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, beschrieben.

Beispiel 8

Identifikation von Zielgenen durch Sichtung von Expressionsbanken mit Antikörpern

[0228] Es wurden cDNA-Sequenzen zur Herstellung von rekombinantem Protein zum Beispiel in *E. coli* verwendet (z. B. Qiagen QIAexpress pQE-System). Die rekombinanten Proteine wurden dann gewöhnlich über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Qiagen) affinitätsgereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden dann zur Herstellung spezifischer Antikörper beispielsweise unter Verwendung von Standardtechniken zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Anschließend wurden die Antikörper dann unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule, die mit rekombinantem Antigen vorge-sättigt wird, affinitätsgereinigt, wie von Gu et al., (1994) *BioTechniques* 17: 257–262 beschrieben. Der Antikörper kann dann zur Durchmusterung von Expressions-cDNA-Banken mittels immunologischem Sichtung verwendet werden (Sambrook, J., et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F. M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

Beispiel 9

Transformation von *Agrobacterium*

[0229] Die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel unter Verwendung des GV3101-(pMP90-) (Koncz und Schell, *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986) 383–396) oder LBA4404- (Clontech) oder C58C1 pGV2260 (Deblaere et al. 1984, *Nucl. Acids Res.* 13, 4777–4788) *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (ebenfalls Deblaere et al. 1984).

Beispiel 10

Pflanzentransformation

[0230] Die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation kann unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerationstechniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., *Plant Molecular Biology Manual*, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

[0231] Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., *Plant Cell* 8 (1989) 238–242; De Block et al., *Plant Physiol.* 91 (1989) 694–701). Die Verwendung von Antibiotika für die *Agrobacterium*- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und *Agrobacterium*-Stamm ab. Die Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

[0232] Der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) *Plant Cell Report* 13: 282–285 beschriebenen Technik durchführen.

[0233] Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Ili-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

[0234] Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York.

Beispiel 11

Plasmide für die Pflanzentransformation

[0235] Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR (Höfgen und Willmitzer, *Plant Science* 66 (1990) 221–230) oder pGPTV (Becker et al. 1992, *Plant Mol. Biol.* 20: 1195–1197) oder Derivate davon verwendet werden. Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA. Die binären Vektoren können unterschiedliche Markergene tragen. Insbesondere kann das nptII-Markergen codierend für Kanamycin-Resistenz vermittelt durch Neomycinphosphotransferase gegen die herbizidresistente Form eines Acetolactat Synthasegens (Abkürzung: AHAS oder ALS) ausgetauscht werden. Das ALS-Gen ist beschrieben in Ott et al., *J. Mol. Biol.* 1996, 263: 359–360. Der v-ATPase-c1-Promotor kann in das Plasmid pBin19 oder pGPTV kloniert werden und durch Klonierung vor das ALS Codierregion für die Markergenexpression genutzt werden. Der genannte Promotor entspricht einem 1153 Basenpaarfragment aus beta-Vulgaris (*Plant Mol Biol*, 1999, 39: 463–475). Dabei können sowohl Sulphonylharnstoffe als auch Imidazolinone wie Imazethapyr oder Sulphonylharnstoffe als Antimetaboliten zur Selektion verwendet werden.

[0236] Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der DC3- oder der LeB4- oder der USP-Promotor oder der Phaseolin-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement wie z. B. der Napin- oder Arcelin Promotor (Goossens et al. 1999, *Plant Phys.* 120(4): 1095–1103 und Gerhardt et al. 2000, *Biochimica et Biophysica Acta* 1490(1–2): 87–98) kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor oder ein v-ATPase C1 Promotor verwenden.

[0237] Insbesondere lassen sich Gene codierend für Desaturasen und Elongasen durch Konstruktion mehrerer Expressionskassetten hintereinander in einen binären Vektor klonieren, um den Stoffwechselweg in Pflanzen nachzubilden.

[0238] Innerhalb einer Expressionskassette kann das zu exprimierende Protein unter Verwendung eines Signalpeptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kernode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285–423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein zu erreichen.

[0239] Beispiele für Multiexpressionskassetten sind im folgenden gegeben.

I. Promotor-Terminator-Kassetten

[0240] Expressionskassetten bestehen aus wenigstens zwei funktionellen Einheiten wie einem Promotor und einem Terminator. Zwischen Promotor und Terminator können weitere gewünschte Gensequenzen wie Targetting-Sequenzen, Codierregionen von Genen oder Teilen davon etc. eingefügt werden. Zum Aufbau von Expressionskassetten werden Promotoren und Terminatoren (USP Promotor: Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459–67; OCS Terminator: Gielen et al. EMBO J. 3 (1984) 835ff.) mithilfe der Polymerasekettenreaktion isoliert und mit flankierenden Sequenzen nach Wahl auf Basis von synthetischen Oligonukleotiden maßgeschneidert.

[0241] Folgende Oligonukleotide können beispielsweise verwendet werden:

USP1 vorne: CCGGAATTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA

USP2 vorne: CCGGAATTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA

USP3 vorne: CCGGAATTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA

USP1 hinten: AAAACTGCAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCTGGCTATGAAGAAATT

USP2 hinten: CGCGGATCCGCTGGCTATGAAGAAATT

USP3 hinten: TCCCCCGGGATCGATGCCGCGCAGATCTGCTGGCTATGAAGAAATT

OCS1 vorne: AAAACTGCAGTCTAGAAGGCCTCCTGCTTTAATGAGATAT

OCS2 vorne: CGCGGATCCGATATCGGGCCCGCTAGCGTTAACCTGCTTTAATGAGATAT

OCS3 vorne: TCCCCCGGGCCATGGCCTGCTTTAATGAGATAT

OCS1 hinten: CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

OCS2 hinten: CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

OCS3 hinten: CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGTTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

[0242] Die Methoden sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und sind allgemein literaturbekannt.

[0243] In einem ersten Schritt werden ein Promotor und ein Terminator über PCR amplifiziert. Dann wird der Terminator in ein Empfängerplasmid kloniert und in einem zweiten Schritt der Promotor vor den Terminator inseriert. Mithin erhält man eine Expressionskassette auf einem Trägerplasmid. Auf Basis des Plamides pUC19 werden die Plasmide pUT1, pUT2 und pUT3 erstellt.

[0244] Die Konstrukte sind erfindungsgemäß in SEQ ID NO: 13, 14 und 15 definiert. Sie enthalten auf Basis von pUC19 den USP-Promotor und den OCS Terminator. Auf Basis dieser Plasmide wird das Konstrukt pUT12 erstellt, indem pUT1 mittels SalI/ScaI geschnitten wird und pUT2 mittels XhoI/ScaI geschnitten wird. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzelung ampicillin-resistenter Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die zwei Expressionskassetten enthalten. Die XhoI/SalI Ligation kompatibler Enden hat dabei die beiden Schnittstellen XhoI und SalI zwischen den Expressionskassetten eliminiert. Es resultiert das Plasmid pUT12, das in SEQ ID NO: 16 definiert ist. Anschließend wird pUT12 wiederum mittels SalI/ScaI geschnitten und pUT3 mittels XhoI/ScaI geschnitten. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzelung ampicillinresistenter Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die drei Expressionskassetten enthalten. Auf diese Weise wird ein Set von Multiexpressionskassetten geschaffen, dass für die Insertion gewünschter DNA genutzt werden kann und in Tabelle 3 beschrieben wird und zudem noch weitere Expressionskassetten aufnehmen kann.

[0245] Diese enthalten folgende Elemente:

Tabelle 3

pUC19-Derivat	Schnittstellen vor dem USP Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
pUT1	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
pUT2	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
pUT3	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/ AscI/HindIII
pUT12 Doppel-expressionskassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
pUT123 Tripel-expressionskassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	1.BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und 2.BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI und 3.BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

[0246] Weiterhin lassen sich wie beschrieben und wie in Tabelle 4 näher spezifiziert weitere Multiexpressionskassetten mithilfe des

- i) USP-Promotors oder mithilfe des
- ii) ca. 700 Basenpaare 3'-Fragmentes des LeB4-Promotors oder mithilfe des
- iii) DC3-Promotors erzeugen und für samenspezifische Genexpression einsetzen.

[0247] Der DC3-Promotor ist beschrieben bei Thomas, Plant Cell 1996, 263: 359–368 und besteht lediglich aus der Region –117 bis +27, weshalb er mithin einer der kleinsten bekannten samenspezifischen Promotoren darstellt. Die Expressionskassetten können mehrfach den selben Promotor enthalten oder aber über drei verschiedene Promotoren aufgebaut werden.

Tabelle 4

Multiple Expressionskassetten

Plasmidname des pUC19-Derivates	Schnittstellen vor dem jeweiligen Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
pUT1 (pUC19 mit USP-OCS1)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/PstI/ XbaI/StuI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/ HindIII
pDCT (pUC19 mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/ HindIII
pLeBT (pUC19-mit LeB4(700)-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII
pUD12 (pUC 19 mit mit USP-OCS1 und mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/ HindIII
pUDL123 Triple expression cassette (pUC19 mit USP/ DC3 und LeB4-700)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/ (EcoRV*)/ApaI/ NheI/HpaI und (3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

* EcoRV Schnittstelle schneidet im 700 Basenpaarfragment des LeB4 Promotors (LeB4-700).

[0248] Analog lassen sich weitere Promotoren für Multigenkonstrukte erzeugen insbesondere unter Verwendung des

- a) 2,7 kb Fragmentes des LeB4-Promotors oder mithilfe des
- b) Phaseolin-Promotors oder mithilfe des
- c) konstitutiven v-ATPase c1-Promotors.

5 **[0249]** Es kann insbesondere wünschenswert sein, weitere besonders geeignete Promotoren zum Aufbau samenspezifischer Multiexpressionskassetten wie z. B. den Napin-Promotor oder den Arcelin-5 Promotor zu verwenden.

ii) Erstellung von Expressionskonstrukten in pUC19- oder pGPTV Derivaten, die Promotor und Terminator erhalten und in Kombination mit gewünschten Gensequenzen zur PUFA Genexpression in pflanzlichen Expressionskassetten enthalten

10

[0250] Multiexpressionskassetten können mittels AscI direkt von pUC19-Derivaten aus Tabelle 3 in den Vektor pGPTV+AscI (siehe iii)) über die AscI Schnittstelle inseriert werden und stehen zur Inserierung von Zielgenen zur Verfügung. Die entsprechenden Genkonstrukte (pBUT1 ist in SEQUENZ ID NO: 20, pBUT2 ist in SEQUENZ ID NO: 21, pBUT3 ist in SEQUENZ ID NO: 22, pBUT12 ist in SEQUENZ ID NO: 22 und pBUT123 ist in SEQUENZ ID NO: 24 dargestellt) stehen erfindungsgemäß als Kit zur Verfügung. Alternativ können Gensequenzen in die pUC19 basierten Expressionskassetten inseriert werden und als AscI Fragment in pGPTV+AscI eingesetzt werden.

15

[0251] In pUT12 wird zunächst über BstXI und XbaI die Δ -6-Elongase Pp_PSE1 in die erste Kassette inseriert. Dann wird die Δ -6-Desaturase aus Moos (Pp_des6) über BamHI/NaeI in die zweite Kassette inseriert. Es entsteht das Konstrukt pUT-ED. Das AscI Fragment aus dem Plasmid pUT-ED wird in den mit AscI geschnittenen Vektor pGPTV+AscI inseriert und die Orientierung des inserierten Fragmentes mittels Restriktion oder Sequenzierung ermittelt. Es entsteht das Plasmid pB-DHGLA, dessen vollständige Sequenz in SEQUENZ ID NO: 25 dargestellt ist. Die Codierregion der Physcomitrella delta 6 Elongase ist in SEQUENZ ID NO: 26 dargestellt, die der delta 6 Desaturase aus Physcomitrella in SEQUENZ ID NO: 27.

20

[0252] In pUT123 wird zunächst über BstXI und XbaI die Δ -6-Elongase Pp_PSE1 in die erste Kassette inseriert. Dann wird die Δ -6-Desaturase aus Moos (Pp_des6) über BamHI/NaeI in die zweite Kassette inseriert und schließlich die Δ -5-Desaturase aus Phaeodactylum (Pt_des5) über BglII in die dritte Kassette inseriert. Das Dreifachkonstrukt erhält den Namen pARA1. Unter Berücksichtigung sequenzspezifischer Restriktionsschnittstellen können weitere Expressionskassetten gemäß Tabelle 5 mit der Bezeichnung pARA2, pARA3 und pARA4 erstellt werden.

25

[0253] Das AscI Fragment aus dem Plasmid pARA1 wird in den mit AscI geschnittenen Vektor pGPTV+AscI inseriert und die Orientierung des inserierten Fragmentes mittels Restriktion oder Sequenzierung ermittelt. Die vollständige Sequenz des resultierenden Plasmides pBARA1 ist in SEQUENZ ID NO: 28 dargestellt. Die Codierregion der Physcomitrella delta 6 Elongase ist in SEQUENZ ID NO: 29 dargestellt, die der delta 6 Desaturase aus Physcomitrella in SEQUENZ ID NO: 30 und die der delta-5 Desaturase aus Phaeodactylum tricornutum in SEQUENZ ID NO: 31.

30

Tabelle 5

Kombinationen von Desaturasen und Elongasen

40

	Gen Plasmid	Δ -6-Desaturase	Δ -5-Desaturase	Δ -6-Elongase
	1 PUT-ED	Pp_des6	---	Pp_PSE1
	2 pARA1	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1
45	3 pARA2	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
	4 pARA3	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
	5 pARA4	Ce_des6	Ce_des5	Ce_PSE1
	6 PBDHGLA	Pt_des6	---	Pp_PSE1
50	7 PBARA1	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1

50

Plasmide 1 bis 5 sind pUC Derivate, Plasmide 6 bis 7 sind binäre Pflanzentransformationsvektoren.

Pp = Physcomitrella patens, Pt = Phaeodactylum tricornutum

Pp_PSE1 entspricht der Sequenz aus SEQ ID NO: 9.

55

PSE = PUFA spezifische Δ -6-Elongase

Ce_des5 = Δ -5-Desaturase aus Caenorhabditis elegans (Genbank Acc. Nr. AF078796)

Ce_des6 = Δ -6-Desaturase aus Caenorhabditis elegans elegans (Genbank Acc. Nr. AF031477, Basen 11-1342)

Ce_PSE1 = Δ -6-Elongase aus Caenorhabditis elegans (Genbank Acc. Nr. AF244356, Basen 1-867).

60

[0254] Auch weitere Desaturasen oder Elongasegensequenzen können in Expressionskassetten beschriebener Art inseriert werden wie z. B. Genbank Acc. Nr. AF231981, NM_013402, AF206662, AF268031, AF226273, AF210510 oder AF110509.

iii) Transfer von Expressionskassetten in Vektoren zur Transformation von Agrobacterium tumefaciens und zur Transformation von Pflanzen

65

[0255] Chimäre Genkonstrukte auf Basis der in pUC19 beschriebenen können mittels AscI in den binären Vektor pGPTV inseriert werden. Die multiple Klonierungssequenz wird zu diesem Zweck um eine AscI Schnittstelle erweitert. Zu diesem Zweck wird der Polylinker als zwei doppelsträngige Oligonukleotide neu synthetisiert, wobei eine zusätzliche

AscI DNA Sequenz eingefügt wird. Das Oligonukleotid wird mittels EcoRI und HindIII in den Vektor pGPTV inseriert. Es entsteht das Plasmid pGPTV+AscI. Die notwendigen Kloniertechniken sind dem Fachmann bekannt und können einfach wie in Beispiel 1 beschrieben nachgelesen werden.

Beispiel 12

5

In vivo-Mutagenese

[0256] Die in vivo-Mutagenese von Mikroorganismen kann mittels Passage der Plasmid- (oder einer anderen Vektor-) DNA durch E. coli oder andere Mikroorganismen (z. B. Bacillus spp. oder Hefen, wie Saccharomyces cerevisiae), bei denen die Fähigkeiten, die Unversehrtheit ihrer genetischen Information aufrechtzuerhalten, gestört ist, erfolgen. Übliche Mutator-Stämme haben Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem (z. B. mutHLS, mutD, mutT usw.; als Literaturstelle siehe Rupp, W. D. (1996) DNA repair mechanisms, in: Escherichia coli and Salmonella, S. 2277–2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist beispielsweise in Greener, A., und Callahan, M. (1994) Strategies 7: 32–34, erläutert. Der Transfer mutierter DNA-Moleküle in Pflanzen erfolgt vorzugsweise nach Selektion und Test der Mikroorganismen. Transgene Pflanzen werden nach verschiedenen Beispielen im Beispielteil dieses Dokumentes erzeugt.

Beispiel 13

20

Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

[0257] Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus kann auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen werden.

[0258] Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so dass, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E. R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6: 317–326 beschriebene, präpariert werden.

Northern-Hybridisierung

35

[0259] Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit einer Stärke von 1,25% unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 × SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10% Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1% SDS, 100 mg Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von alpha-³²P-dCTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschritte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 × SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 × SSC, 1% SDS, bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei –70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

[0260] Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

Beispiel 14

Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

60

[0261] Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d. h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman,

Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89–90 und S. 443–613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469–714, VCH: Weinheim; Belter, P. A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J. F., und Cabral, J. M. S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J. A., und Henry, J. D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1–27, VCH: Weinheim; und Dechow, F. J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

[0262] Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22): 12935–12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152: 141–145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research", Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) – 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

[0263] Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z. B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P. M. Rhodes und P. F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103–129; 131–163 und 165–192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

[0264] Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

[0265] Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119–169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33: 343–353).

[0266] Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2% Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d. h. Sigma), definiert werden.

[0267] Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, muss die Identität über Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise muss die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben) gezeigt werden.

Expressionskonstrukte in heterologen mikrobiellen Systemen

45

Stämme, Wachstumsbedingungen und Plasmide

[0268] Der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF⁺ kan (Stratagene) wurde zur Subklonierung der neuen Desaturase pPDesaturase1 aus *Physcomitrella patens* verwendet. Für die funktionelle Expression dieses Gens verwendeten wir den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSc 1 (Invitrogen Co.). *E. coli* wurde in Luria-Bertini-Brühe (LB, Duchefa, Haarlem, Niederlande) bei 37°C kultiviert. Wenn nötig, wurde Ampicillin (100 mg/Liter) zugegeben, und 1,5% Agar (Gew./Vol.) wurde für feste LB-Medien hinzugefügt. *S. cerevisiae* wurde bei 30°C entweder in YPG-Medium oder in komplettem Minimalmedium ohne Uracil (CMdum; siehe in: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., Albright, L. B., Coen, D. M., und Varki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) mit entweder 2% (Gew./Vol.) Raffinose oder Glucose kultiviert. Für feste Medien wurden 2% (Gew./Vol.) Bacto™-Agar (Difco) hinzugefügt. Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide sind pUC18 (Pharmacia) und pYES2 (Invitrogen Co.).

60

Klonierung und Expression PUFA-spezifischer Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*

[0269] Für die Expression in Hefe wurden die *Phaeodactylum tricornutum* -cDNA-Klone aus SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bzw. die Sequenzen aus SEQ ID NO: 7 oder 9 bzw. andere gewünschte Sequenzen zuerst so modifiziert, dass lediglich die Codierregion mittels Polymerase Kettenreaktion unter Zuhilfenahme zweier Oligonukleotide amplifiziert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Konsensussequenz vor dem Startcodon zur effizienten Translation eingehalten wurde. Entweder wurde hierzu die Basenfolge ATA oder AAA gewählt und vor das ATG in die Sequenz eingefügt (Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by euka-

ryotic ribosomes, Cell 44, 283–292). Vor diesem Konsensustriplett wurde zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle eingeführt, die kompatibel sein muss zur Schnittstelle des Zielvektors, in den das Fragment kloniert werden soll und mit dessen Hilfe die Genexpression in Mikroorganismen oder Pflanzen erfolgen soll.

[0270] Die PCR-Reaktion wurde mit Plasmid-DNA als Matrize in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA- (Stratagene) Polymerase und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 2 min bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C. Die Anlagerungstemperatur wurde je nach gewählten Oligonukleotiden variiert. Pro Kilobasenpaare DNA ist von einer Syntheszeit von etwa einer Minute auszugehen. Weitere Parameter, die Einfluss auf die PCR haben wie z. B. Mg-Ionen, Salz, DNA Polymerase etc., sind dem Fachmann auf dem Gebiet geläufig und können nach Bedarf variiert werden.

[0271] Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktionskit (QIAGEN) extrahiert und in die SmaI-Restriktionsstelle des dephosphorylierten Vektors pUC18 unter Verwendung des Sure Clone Ligations Kit (Pharmacia) ligiert, wobei die pUC-Derivate erhalten wurden. Nach der Transformation von E. coli XL1 Blue MRF⁺ kan wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs, M. G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid miniprep. BioTechniques 4, 310–313) an ampicillinresistenten Transformanten durchgeführt, und positive Klone mittels BamHI-Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.

[0272] $\Delta 5$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des5

Primer 1 GAG CTC ACA TAA TGG CTC CGG ATG CGG ATA AGC

Primer 2 CTC GAG TTA CGC CCG TCC GGT CAA GGG

[0273] Das PCR-Fragment (1428 bp) wurde mithilfe des Sure Clone Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment SacI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

[0274] $\Delta 6$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des6

Primer 3 GGA TCC ACA TAA TGG GCA AAG GAG GGG ACG CTC GGG

Primer 4 CTC GAG TTA CAT GGC GGG TCC ATC GGG

[0275] Das PCR-Fragment (1451 bp) wurde mithilfe des Sure Clone Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment BamHI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

[0276] $\Delta 12$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des12

Primer 5 GGA TCC ACA TAA TGG TTC GCT TTT CAA CAG CC

Primer 6 CTC GAG TTA TTC GCT CGA TAA TTT GC

[0277] $\Delta 12$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des12.2

Primer 7 GGA TCC ACA TAA TGG GTA AGG GAG GTC AAC G

Primer 8 CTC GAG TCA TGC GGC TTT GTT TCG C

[0278] Das PCR Fragment (1505 bp) wurde mithilfe des Sure Clone Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment BamHI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

[0279] Die Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzym/en passend zur eingeführten Schnittstelle der Primersequenz gespalten und das erhaltene Fragment in die kompatiblen Restriktionsstellen des dephosphorylierten Hefe-E. coli-Shuttlevektors pYES2 oder pYES6 ligiert, wobei pYES-Derivate erhalten werden. Nach der Transformation von E. coli und DNA-Minipräparation aus den Transformanten wurde die Orientierung des DNA-Fragments im Vektor durch geeignete Restriktionsspaltung oder Sequenzierung überprüft. Ein Klon wurde für die DNA-Maxipräparation mit dem Nucleobond® AX 500 Plasmid-DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel, Düringen) angezogen.

[0280] *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 wurde mit den pYES-Derivaten und pYES Leervektor mittels eines PEG/Lithiumacetat-Protokolls transformiert (Ausubel et al., 1995). Nach der Selektion auf CMdum-Agarplatten mit 2% Glucose wurden pYES-Derivate-Transformanten und eine pYES2-Transformante zur weiteren Anzucht und funktionellen Expression ausgewählt. Bei pYES6-Derivaten wurde Blastidicin als Antimetabolit verwendet. Im Fall von Coexpressionen auf Basis von pYES2 und pYES6 wurde auf Minimalmedium mit Blastidicin selektiert.

Funktionelle Expression einer Desaturaseaktivität in Hefe

Vorkultur

[0281] 20 ml CMdum-Flüssigmedium ohne Uracil aber mit 2% (Gew./Vol.) Raffinose wurden mit den transgenen Hefeklonen (pYES2) angeimpft und 3 Tage bei 30°C, 200 rpm gezüchtet, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 1,5 bis 2 erreicht wurde. Wurde als Vektor pYES6 verwendet, so wurde zusätzlich auf Blastidicin als Antimetabolit selektioniert.

Hauptkultur

[0282] Für die Expression wurden 20 ml CMdum-Flüssigmedium ohne Uracil aber mit 2% Raffinose und 1% (Vol./Vol.) Tergitol NP-40 mit Fettsäuresubstraten auf eine Endkonzentration von 0,003% (Gew./Vol.) angereichert. Die Medien wurden mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 2% (Gew./Vol.) Galaktose für 16 Std. induziert, wonach die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,8–1,2 geerntet wurden.

Fettsäureanalyse

[0283] Die Gesamt-Fettsäuren wurden aus Hefekulturen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Davon wurden Zellen von 5 ml Kultur mittels Zentrifugation (1000 × g, 10 min, 4°C) geerntet und einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Zur Herstellung des Fettsäuremethylester (FAMES oder Singular FAME) wurden die Zellsedimente mit 1 M methanolischer H₂SO₄ und 2% (Vol./Vol.) Dimethoxypropan für 1 Std. bei 80°C behandelt. Die FAMES wurden zweimal mit 2 ml Petrolether extrahiert, einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde unter einem Argonstrom verdampft, und die FAMES wurden in 50 µl Petrolether gelöst. Die Proben wurden auf einer ZEBRON-ZB-Wax-Kapillarsäule (30 m, 0,32 mm, 0,25 µm; Phenomenex) in einem Hewlett Packard-6850-Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor aufgetrennt. Die Ofentemperatur wurde von 70°C (1 min halten) bis 200°C mit einer Rate von 20°C/min, dann auf 250°C (5 min halten) mit einer Rate von 5°C/min und schließlich auf 260°C mit einer Rate von 5°C/min programmiert. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet (4,5 ml/min bei 70°C). Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit Retentionszeiten von FAME-Standards (SIGMA) identifiziert.

Expressionsanalyse

[0284] Die Verhältnisse der zugegebenen und aufgenommenen Fettsäuresubstrate wurden ermittelt und so Quantität und Qualität der Desaturaseaktion gemäß Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8 erfasst.

[0285] Ergebnis der Expression einer Phaeodactylum tricornutum Δ-6-Acyl Lipid Desaturase in Hefe:

Tabelle 6

Fettsäure	pYes2	pYes2-Ptd6 gefüttert mit		
	–	–	+18:2	+18:3
16:0	13,3	18,9	28,4	16,7
16:1Δ9	45,4	44,7	12,5	16,9
16:2Δ6,9	–	4,3	–	–
18:0	4,9	6,3	10,4	9,1
18:1Δ9	36,4	24,1	6,8	11,8
18:2Δ6,9	–	1,8	–	–
18:2Δ9,12	–	–	33,4	–
18:3Δ6,12,15	–	–	4,9	–
18:3Δ9,12,15	–	–	–	43,1
18:4Δ6,9,12,15	–	–	–	2,3

[0286] Die Angaben stellen Mol-% entsprechender cis-Fettsäuren dar.

[0287] Ergebnis der Expression einer Phaeodactylum tricornutum Δ-5-Acyl Lipid Desaturase in Hefe:

Tabelle 7

Fett- säure	pYES2	pYES_PtD5-Konstrukt gefüttert mit								
	Leer	Kon- trolle	18:2	18:3	20:1	20:1	20:2	20:3	20:3	
					$\Delta 8$	$\Delta 11$	$\Delta 11,14$	$\Omega 3$	$\Omega 6$	
16:0 Δ	16,9	20,4	27,7	24,4	16,2	21	17,6	19,5	22,8	5
16:1 $\Delta 9$	44,7	44,1	13,2	9,6	37,4	39,4	38,3	36,9	30,7	10
18:0	6,1	6,9	10,54	9,8	4,7	7,9	6,3	6,8	8,2	
18:1 $\Delta 9$	31,72	28,1	8,77	6	15	26	29,5	25,6	21,1	
18:2 $\Delta 5,9$		0,17	0	0	0	0,09	0,21	0,09	9	
18:2 $\Delta 9,12$		-	39,7	-	-	-	-	-	-	15
18:3 $\Delta 9,12,15$		-		49,9	-	-	-	-	-	
20:1 $\Delta 8$		-	-		25,5	-	-	-	-	
20:1 $\Delta 11$		-	-	-		5,41	-	-	-	20
20:2 $\Delta 5,11$		-	-	-		0,21	-	-	-	
20:2 $\Delta 11,14$		-	-	-	-		6,48	-	-	
20:3 $\Delta 5,11,14$		-					0,76	-	-	
20:3 $\Delta 11,14,17$		-	-	-	-	-		9,83	-	25
20:3 $\Delta 8,11,14$		-	-	-	-	-	-		13,69	
20:4 $\Delta 5,11,14,17$		-	-	-	-	-	-	1,16	-	
20:4 $\Delta 5,8,11,14$		-	-	-	-	-	-	-	3,08	30

[0288] Die Angaben stellen Mol-% Fettsäuren von cis-Fettsäuren dar.

[0289] Aus weiteren Fütterungsversuchen wurde gefunden, dass C18 : 1 $\Delta 9$ in der Anwesenheit von C18 : 2 $\Delta 9,11$ oder C18 : 3 $\Delta 9,12,15$ oder C20 : 1 $\Delta 8$ Fettsäuren nicht desaturiert wurde, während in Anwesenheit von C20 : 1 $\Delta 11$, C20 : 2 $\Delta 11,14$ und C20 : 3 $\Delta 8,11,14$ auch C18 : 1 desaturiert wird. Ebenfalls keine Desaturierung erfolgte in Anwesenheit von C20 : 3 $\Delta 8,11,14$.

[0290] Bei Nutzung des Protease-defizienten Hefestammes C13BYS86 (Kunze, I. et al., Biochemica et Biophysica Acta (1999) 1410: 287–298) für die Expression der Δ -5-Desaturase aus Phaeodactylum tricornutum auf Vollmedium mit Blasticidin wurde gefunden, dass C20 : 4 $\Delta 8,11,14,17$ als Substrat der Δ -5-Desaturase mit 20% Umsatzrate ebenso gut umgesetzt wurde wie C20 : 3 $\Delta 8,11,14$. Alternativ können auch die Auxotrophiemarker leu2, ura3 oder his für Genexpression genutzt werden.

[0291] In einem weiteren Coexpressionsexperiment von Δ -5 Desaturase aus Phaeodactylum und Δ -6 Elongase aus Physcomitrella wurde der Stamm UTL7A (Warnecke et al., J. Biol. Chem. (1999) 274(19): 13048–13059) benutzt, wobei die Δ -5 Desaturase ca. 10% C20 : 3 $\Delta 8,11,14$ zu C20 : 4 $\Delta 5,8,11,14$ umsetzte.

[0292] Weitere Fütterungsexperimente mit verschiedensten anderen Fettsäuren allein oder in Kombination (z. B. Linolsäure, 20 : 3 Δ -5,11,14-Fettsäure, alpha- oder gamma-Linolensäure, Stearidonsäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure etc.) können zur detaillierteren Bestätigung der Substratspezifität und -selektivität dieser Desaturasen durchgeführt werden.

Tabelle 8

Ergebnis der Coexpression einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ -5-Acyl Lipid Desaturase und einer Δ -6 Elongase aus Moos in Hefe auf Basis der Expressionsvektoren pYes2 und pYes6

	pYes2-Elo		pYes2-Elo and pYes6-Ptd5	
	+18:3	+18:4	+18:3	+18:4
16:0	15,0	14,8	15,6	15,1
16:1 Δ 9	27,7	29,2	27,5	29,0
18:0	5,6	6,3	5,7	6,4
18:1 Δ 9	17,1	30,8	27,4	31,6
18:3 Δ 6,9,12	7,60	–	7,8	–
18:4 Δ 6,9,12,15	–	6,71	–	6,4
20:3 Δ 8,11,14	15,92	–	13,55	–
20:4 Δ 5,8,11,14	–	–	1,31	–
20:4 Δ 8,11,14,17	–	11,4	–	10,31
20:5 Δ 5,8,11,14,17	–	–	–	0,53

[0293] Aus den Substratumsetzungen geht hervor, dass die verwendete Δ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum* und die Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella patens* bzgl. der Substrataktivität und insbesondere der Substratspezifität geeignet sind, um Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure mithilfe erfindungsgemäßer Sequenzen zu produzieren.

[0294] Die Fragmentierungsmuster und Massenspektren von DMOX-Derivaten von Standards als auch den Peakfraktionen per GC identifizierter Fettsäuren der in Tabelle 6, 7 und 8 aufgeführten, zeigen vergleichsweise identische Ergebnisse, wodurch die jeweilige Position der Doppelbindung über die bloße GC-Detektion hinaus abgesichert wurde.

Beispiel 17

Reinigung des gewünschten Produktes aus transformierten Organismen

[0295] Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus Pflanzenmaterial oder Pilzen, Algen, Ciliaten, tierischen Zellen oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kulturen kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt nicht aus den Zellen sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standardtechniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Organe von Pflanzen können mechanisch von anderem Gewebe oder anderen Organen getrennt werden. Nach der Homogenisation werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraction, welche die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung aufbewahrt. Wird das Produkt aus gewünschten Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraction wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

[0296] Die Überstandsfraction aus jedem Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können wenn nötig wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl geeigneter Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

[0297] Im Fachgebiet ist ein breites Spektrum an Reinigungsverfahren bekannt, und das vorstehende Reinigungsverfahren soll nicht beschränkend sein. Diese Reinigungsverfahren sind zum Beispiel beschrieben in Bailey, J. E., & Ollis, D. F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: New York (1986).

[0298] Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standardtechniken des Fachgebiets bestimmt werden. Dazu gehören Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, insbesondere Dünnschichtchromatographie und Flammenionisationsdetektion (IA-TROSCAN, Iatron, Tokio, Japan), NIRS, Enzymtest oder mikrobiologisch. Eine Übersicht über diese Analyseverfahren siehe in: Patek et al. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 133–140; Malakhova et al. (1996) *Biotekhnologiya* 11: 27–32; und Schmidt et al. (1998) *Bioprocess Engineer.* 19: 67–70. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89–90, S. 521–540, S. 540–547, S. 559–566, 575–581 und S. 581–587; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons; Fallon, A., et al. (1987) *Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Bd. 17.

Äquivalente

[0299] Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den

DE 101 02 337 A 1

Patentansprüchen umfasst sein.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH	5
<120> Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, neue Biosynthesegene sowie neue pflanzliche Expressionskonstrukte	10
<130> 2000_873	
<140> 2000_873	15
<141> 2000-12-22	
<160> 31	20
<170> PatentIn Vers. 2.0	
<210> 1	25
<211> 1652	
<212> DNA	
<213> Phaeodactylum tricornutum	30
<220>	
<221> CDS	
<222> (115)..(1524)	35
<400> 1	
gacccaacaa acccaacaat cccaacaatc ccatacaacag gaattgggtt tcgttgagtc 60	40
aataattgct agaatccaaa cagacagaca gagaccaacc gcatctatta caga atg 117	
Met	
1	45
gct ccg gat gcg gat aag ctt cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg 165	
Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala	
5 10 15	50
aag cac aat gct gct acc ata tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg 213	
Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu	
20 25 30	55
tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac 261	
Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp	
35 40 45	60
ctc caa tca ttc gat cat ccc ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt 309	
Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly	
50 55 60 65	65

DE 101 02 337 A 1

	ggc aac gat gtc act gta cag tac aag atg att cac ccg tac cat acc	357
	Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr	
5	70 75 80	
	gag aag cat ttg gaa aag atg aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc	405
	Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe	
10	85 90 95	
	gtc tgc gag tac aag ttc gat acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga	453
	Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys Arg	
15	100 105 110	
	gaa gtc ttc aag att gtg cga cga ggc aag gat ttc ggt act ttg gga	501
	Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu Gly	
20	115 120 125	
	tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc tac att gcc att ttc ttc tac ctg cag	549
	Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu Gln	
25	130 135 140 145	
	tac cat tgg gtc acc acg gga acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc tac	597
	Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala Tyr	
30	150 155 160	
	gga atc tcc caa gcg atg att ggc atg aat gtc cag cac gat gcc aac	645
	Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala Asn	
35	165 170 175	
	cac ggg gcc acc tcc aag cgt ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc ctc	693
	His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly Leu	
40	180 185 190	
	ggt gcg gat ttt att ggt ggt tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa cac	741
	Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln His	
45	195 200 205	
	tgg acc cac cac gct tac acc aat cac gcc gag atg gat ccc gat agc	789
	Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp Ser	
50	210 215 220 225	
	ttt ggt gcc gaa cca atg ctc cta ttc aac gac tat ccc ttg gat cat	837
	Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp His	
55	230 235 240	
	ccc gct cgt acc tgg cta cat cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg ccc	885
	Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met Pro	
60	245 250 255	
65		

DE 101 02 337 A 1

gtc ttg gct gga tac tgg ttg tcc gct gtc ttc aat cca caa att ctt	933	
Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile Leu		
260 265 270		5
gac ctc cag caa cgc ggc gca ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac aac	981	
Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp Asn		
275 280 285		10
gct ttc att cac tcg cga cgc aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct gtg	1029	
Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala Val		
290 295 300 305		15
tac att gcg gtg aac gtg att gct ccg ttt tac aca aac tcc ggc ctc	1077	
Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly Leu		
310 315 320		20
gaa tgg tcc tgg cgt gtc ttt gga aac atc atg ctc atg ggt gtg gcg	1125	
Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val Ala		
325 330 335		25
gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc ctg ttt tcg ttg tcg cac aat ttc gaa	1173	
Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Glu		
340 345 350		30
tcc gcg gat cgc gat ccg acc gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa cca	1221	
Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu Pro		
355 360 365		35
gtc gac tgg ttc aag aca cag gtc gaa act tcc tgc act tac ggt gga	1269	
Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly Gly		
370 375 380 385		40
ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa cac	1317	
Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His		
390 395 400		45
cac ttg ttc cca cgc atg agc agc gct tgg tat ccc tac att gcc ccc	1365	
His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro		
405 410 415		50
aag gtc cgc gaa att tgc gcc aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac tac	1413	
Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr Tyr		
420 425 430		55
ccg tgg atc cac caa aac ttt ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac gcg	1461	
Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His Ala		
435 440 445		60
		65

DE 101 02 337 A 1

```

gcc ggg acc ggt gcc aac tgg cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc ttg 1509
Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro Leu
5 450 455 460 465

acc gga cgg gcg taa aagtacacga cagcaccaaa ggtggcgtat ggtgatctct 1564
Thr Gly Arg Ala
10 470

agaaaacaga catagcctac tggaaatatc gacgtccaaa caataatttt aaagactatt 1624
15 tttctgcgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1652

<210> 2
<211> 469
<212> PRT
<213> Phaeodactylum tricornutum
25

<400> 2
Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
30 1 5 10 15

Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
20 25 30

35 Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
35 40 45

40 Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe
50 55 60

45 Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His
65 70 75 80

Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp
50 85 90 95

Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys
100 105 110

55 Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu
115 120 125

60 Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu
130 135 140

65 Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala

```

DE 101 02 337 A 1

145					150					155					160	
Tyr	Gly	Ile	Ser	Gln	Ala	Met	Ile	Gly	Met	Asn	Val	Gln	His	Asp	Ala	5
				165					170					175		
Asn	His	Gly	Ala	Thr	Ser	Lys	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	10
			180					185					190			
Leu	Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Leu	Trp	Gln	Glu	Gln	15
		195					200					205				
His	Trp	Thr	His	His	Ala	Tyr	Thr	Asn	His	Ala	Glu	Met	Asp	Pro	Asp	
	210					215					220					
Ser	Phe	Gly	Ala	Glu	Pro	Met	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Tyr	Pro	Leu	Asp	20
225					230					235				240		
His	Pro	Ala	Arg	Thr	Trp	Leu	His	Arg	Phe	Gln	Ala	Phe	Phe	Tyr	Met	25
			245						250					255		
Pro	Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Trp	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Pro	Gln	Ile	30
		260					265					270				
Leu	Asp	Leu	Gln	Gln	Arg	Gly	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Ile	Arg	Leu	Asp	35
	275					280					285					
Asn	Ala	Phe	Ile	His	Ser	Arg	Arg	Lys	Tyr	Ala	Val	Phe	Trp	Arg	Ala	40
	290					295					300					
Val	Tyr	Ile	Ala	Val	Asn	Val	Ile	Ala	Pro	Phe	Tyr	Thr	Asn	Ser	Gly	
305				310					315					320		
Leu	Glu	Trp	Ser	Trp	Arg	Val	Phe	Gly	Asn	Ile	Met	Leu	Met	Gly	Val	45
			325					330					335			
Ala	Glu	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Ser	His	Asn	Phe	50
		340					345					350				
Glu	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Leu	Lys	Lys	Thr	Gly	Glu	55
	355					360					365					
Pro	Val	Asp	Trp	Phe	Lys	Thr	Gln	Val	Glu	Thr	Ser	Cys	Thr	Tyr	Gly	60
	370					375					380					
Gly	Phe	Leu	Ser	Gly	Cys	Phe	Thr	Gly	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Val	Glu	
385				390						395				400		
His	His	Leu	Phe	Pro	Arg	Met	Ser	Ser	Ala	Trp	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Ala	65

DE 101 02 337 A 1

	405	410	415	
5	Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr			
	420	425	430	
10	Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His			
	435	440	445	
15	Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro			
	450	455	460	
20	Leu Thr Gly Arg Ala			
	465			
25	<210> 3			
	<211> 1434			
	<212> DNA			
	<213> Phaeodactylum tricornutum			
30	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)..(1434)			
35	<400> 3			
	atg ggc aaa gga ggg gac gct cgg gcc tcg aag ggc tca acg gcg gct	48		
	Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala			
	1 5 10 15			
40	cgc aag atc agt tgg cag gaa gtc aag acc cac gcg tct ccg gag gac	96		
	Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp			
	20 25 30			
45	gcc tgg atc att cac tcc aat aag gtc tac gac gtg tcc aac tgg cac	144		
	Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His			
	35 40 45			
50	gaa cat ccc gga ggc gcc gtc att ttc acg cac gcc ggt gac gac atg	192		
	Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met			
	50 55 60			
55	acg gac att ttc gct gcc ttt cac gca ccc gga tcg cag tcg ctc atg	240		
	Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met			
	65 70 75 80			
60	aag aag ttc tac att ggc gaa ttg ctc ccg gaa acc acc ggc aag gag	288		
	Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu			
	85 90 95			

DE 101 02 337 A 1

ccg cag caa atc gcc ttt gaa aag ggc tac cgc gat ctg cgc tcc aaa	336	
Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys		
100 105 110		5
ctc atc atg atg ggc atg ttc aag tcc aac aag tgg ttc tac gtc tac	384	
Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr		
115 120 125		10
aag tgc ctc agc aac atg gcc att tgg gcc gcc gcc tgt gct ctc gtc	432	
Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val		
130 135 140		15
ttt tac tcg gac cgc ttc tgg gta cac ctg gcc agc gcc gtc atg ctg	480	
Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu		
145 150 155 160		20
gga aca ttc ttt cag cag tcg gga tgg ttg gca cac gac ttt ctg cac	528	
Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His		
165 170 175		25
cac cag gtc ttc acc aag cgc aag cac ggg gat ctc gga gga ctc ttt	576	
His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe		
180 185 190		30
tgg ggg aac ctc atg cag ggt tac tcc gta cag tgg tgg aaa aac aag	624	
Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys		
195 200 205		35
cac aac gga cac cac gcc gtc ccc aac ctc cac tgc tcc tcc gca gtc	672	
His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val		
210 215 220		40
gcg caa gat ggg gac ccg gac atc gat acc atg ccc ctt ctc gcc tgg	720	
Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp		
225 230 235 240		45
tcc gtc cag caa gcc cag tct tac cgg gaa ctc caa gcc gac gga aag	768	
Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys		
245 250 255		50
gat tcg ggt ttg gtc aag ttc atg atc cgt aac caa tcc tac ttt tac	816	
Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr		
260 265 270		55
ttt ccc atc ttg ttg ctc gcc cgc ctg tcg tgg ttg aac gag tcc ttc	864	
Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe		
275 280 285		60
		65

DE 101 02 337 A 1

	aag tgc gcc ttt ggg ctt gga gct gcg tcg gag aac gct gct ctc gaa	912
	Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu	
5	290 295 300	
	ctc aag gcc aag ggt ctt cag tac ccc ctt ttg gaa aag gct ggc atc	960
	Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile	
10	305 310 315 320	
	ctg ctg cac tac gct tgg atg ctt aca gtt tcg tcc ggc ttt gga cgc	1008
	Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg	
15	325 330 335	
	ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta acc gcg acc gcg tcc	1056
	Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser	
20	340 345 350	
	tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc ggc cac aac ggc atg	1104
	Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met	
25	355 360 365	
	gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc tgg aag ctc caa gtc	1152
	Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val	
30	370 375 380	
	acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt ttc ccc caa gcc ttt	1200
	Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe	
35	385 390 395 400	
	gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa gtc gac cac cac tta	1248
	Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu	
40	405 410 415	
	ttc ccc agc ctg ccc cga cac aat ctg gcc aag aca cac gca ctg gtc	1296
	Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val	
45	420 425 430	
	gaa tcg ttc tgc aag gag tgg ggt gtc cag tac cac gaa gcc gac ctt	1344
	Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu	
50	435 440 445	
	gtg gac ggg acc atg gaa gtc ttg cac cat ttg ggc agc gtg gcc ggc	1392
	Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly	
55	450 455 460	
	gaa ttc gtc gtg gat ttt gta cgc gat gga ccc gcc atg taa	1434
	Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met	
60	465 470 475	
65		

DE 101 02 337 A 1

<210> 4
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> Phaeodactylum tricornutum 5

<400> 4
 Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala 10
 1 5 10 15
 Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp 15
 20 25 30
 Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His 20
 35 40 45
 Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met 25
 50 55 60
 Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met 25
 65 70 75 80
 Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu 30
 85 90 95
 Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys 35
 100 105 110
 Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr 40
 115 120 125
 Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val 45
 130 135 140
 Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu 50
 145 150 155 160
 Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His 50
 165 170 175
 His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe 55
 180 185 190
 Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys 60
 195 200 205
 His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val 65

DE 101 02 337 A 1

	210	215	220
5	Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp		
	225	230	235 240
10	Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys		
	245	250	255
15	Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr		
	260	265	270
20	Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe		
	275	280	285
25	Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu		
	290	295	300
30	Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile		
	305	310	315 320
35	Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg		
	325	330	335
40	Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser		
	340	345	350
45	Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met		
	355	360	365
50	Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val		
	370	375	380
55	Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe		
	385	390	395 400
60	Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu		
	405	410	415
65	Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val		
	420	425	430
70	Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu		
	435	440	445
75	Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly		
	450	455	460
80	Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met		

DE 101 02 337 A 1

465

470

475

<210> 5

<211> 1651

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(1554)

<400> 5

gaagaaggaa catataaaag taagccatct cctcggcacc atctaaagac ctaatatcta 60

ctcgtc atg gtt cgc ttt tca aca gcc gct cta ctt tct ctg tcg aca 108

Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr

1

5

10

ttg aca act tca tgt att ggt gcc ttc cag ctg tct tcg cca gca caa 156

Leu Thr Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln

15

20

25

30

ctt ccg aca agt agg ctt cgt cgg cat acg aac acg gcg ccg ctt tcg 204

Leu Pro Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser

35

40

45

gcc gtg gcc gtc gac tcc ggt tct tcc gat ccg gcc ttg gta ggc aac 252

Ala Val Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn

50

55

60

ctc ccc ctt ccc aac aac aat gat aat gag gac aag aac cgt aga atg 300

Leu Pro Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met

65

70

75

cca atg atg gac ttg aaa ggt att gct ctg tct ggt ctc aaa ggg caa 348

Pro Met Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln

80

85

90

gct ctt tcc gtc cga gcg gaa gat ttt cct cag gcg aaa gac ttg cgt 396

Ala Leu Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg

95

100

105

110

gcc gtc att ccg aaa gat tgc ttc gaa ccc gac acg gcc aaa tcg ttg 444

Ala Val Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu

115

120

125

gga tat ctt tcc gtt tca act atg ggg aca att ctc tgc tcc gtc gtc 492

DE 101 02 337 A 1

	Gly Tyr Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val	
	130 135 140	
5	ggc gcg aac ctc ctt agt gtg ctc gat ccc tcc aat cca tta acc tgg	540
	Gly Ala Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp	
	145 150 155	
10	cct ctc tgg gcg gcc tac ggt gcc gtc acg ggg acg gtc gcc atg ggg	588
	Pro Leu Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly	
	160 165 170	
15	ctt tgg gtg ctg gcc cac gaa tgc gga cac ggc gcc ttt tcc aaa aac	636
	Leu Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn	
20	175 180 185 190	
	cga tcc ctc cag gat gcc gtg ggg tac att atc cat tcc atc atg ctg	684
	Arg Ser Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu	
25	195 200 205	
	gtg cca tac ttt agt tgg cag cga tcg cat gcc gtg cat cac cag tat	732
30	Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr	
	210 215 220	
	acc aat cat atg gaa ctg ggg gaa aca cac gtt cct gat cga gcc gat	780
35	Thr Asn His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp	
	225 230 235	
	aag gag ggc gag aag agc ctg gcg ctc cgc cag ttc atg ttg gat tcc	828
40	Lys Glu Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser	
	240 245 250	
	ttt ggt aaa gac aag ggc atg aaa gca tac gga ggc ctc cag tcg ttt	876
45	Phe Gly Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe	
	255 260 265 270	
	ttg cat ctc atc gtg gga tgg cca gcc tac ctc ctg atc ggt gcg acc	924
50	Leu His Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr	
	275 280 285	
	ggt gga ccc gac cgt ggt atg acc aac cat ttt tat ccc aac cct ttg	972
55	Gly Gly Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu	
	290 295 300	
60	tcg acg cca aca cag ccc aag aaa gaa ctt ttc cct ggg aac tgg aaa	1020
	Ser Thr Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys	
	305 310 315	
65	gaa aag gtc tac cag tca gat att gga atc gcc gcc gtt gtc ggc gcc	1068

DE 101 02 337 A 1

Glu Lys Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala		
320	325	330
ctc att gct tgg acc gcc act tcg ggt cta gcc ccc gtc atg gcc ttg	1116	5
Leu Ile Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu		
335	340	345 350
tac ggt ggt ccc ttg atc gtc att aat gcc tgg ctg gta ctg tac acg	1164	10
Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Val Ile Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr		
355	360	365
tgg ttg caa cat aca gat acc gat gtt ccg cac ttt tcc tcc gac aac	1212	15
Trp Leu Gln His Thr Asp Thr Asp Val Pro His Phe Ser Ser Asp Asn		
370	375	380
cac aac ttt gtc aag ggc gca ctg cat acg atc gat cgt ccc tac gac	1260	20
His Asn Phe Val Lys Gly Ala Leu His Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Asp		
385	390	395
aaa ctt gat ccc tgg gga atc ata gac ttt ctg cac cac aag att gga	1308	
Lys Leu Asp Pro Trp Gly Ile Ile Asp Phe Leu His His Lys Ile Gly		30
400	405	410
aca acg cat gtg gca cac cat ttt gac agt act atc ccc cac tat aag	1356	
Thr Thr His Val Ala His His Phe Asp Ser Thr Ile Pro His Tyr Lys		35
415	420	425 430
gct cag att gct acc gat gcc atc aaa gcc aag ttt cca gaa gtg tac	1404	
Ala Gln Ile Ala Thr Asp Ala Ile Lys Ala Lys Phe Pro Glu Val Tyr		40
435	440	445
ctc tat gac ccg aca cca att cca caa gcc atg tgg cgc gtc gcc aag	1452	
Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Pro Gln Ala Met Trp Arg Val Ala Lys		45
450	455	460
gga tgt act gca gta gag caa cgc ggt gac gcc tgg gtg tgg aaa aac	1500	
Gly Cys Thr Ala Val Glu Gln Arg Gly Asp Ala Trp Val Trp Lys Asn		50
465	470	475
gaa gga ata gaa gat ttg gtg gaa cat cgt caa agc aaa tta tcg agc	1548	
Glu Gly Ile Glu Asp Leu Val Glu His Arg Gln Ser Lys Leu Ser Ser		55
480	485	490
gaa taa agcaacatat cgctttatgg aagaacaaac gtccattgtg taaaaccctg	1604	
Glu		60
495		
ataatttcaa tattgtgttt tgttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	1651	65

DE 101 02 337 A 1

<210> 6

<211> 495

<212> PRT

5 <213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 6

```

10 Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr Leu Thr
    1           5           10           15

    Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln Leu Pro
15           20           25           30

    Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser Ala Val
20           35           40           45

    Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn Leu Pro
    50           55           60

25 Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met Pro Met
    65           70           75           80

30 Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln Ala Leu
    85           90           95

    Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg Ala Val
35           100          105          110

    Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu Gly Tyr
40           115          120          125

    Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val Gly Ala
    130          135          140

45 Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp Pro Leu
    145          150          155          160

50 Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly Leu Trp
    165          170          175

    Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn Arg Ser
55           180          185          190

    Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu Val Pro
60           195          200          205

    Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr Thr Asn
65

```

DE 101 02 337 A 1

210	215	220	
His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp Lys Glu			5
225	230	235	240
Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser Phe Gly			10
	245	250	255
Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe Leu His			15
	260	265	270
Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr Gly Gly			
	275	280	285
Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu Ser Thr			20
	290	295	300
Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys Glu Lys			25
305	310	315	320
Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala Leu Ile			30
	325	330	335
Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu Tyr Gly			35
	340	345	350
Gly Pro Leu Ile Val Ile Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu			40
	355	360	365
Gln His Thr Asp Thr Asp Val Pro His Phe Ser Ser Asp Asn His Asn			
	370	375	380
Phe Val Lys Gly Ala Leu His Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Asp Lys Leu			45
385	390	395	400
Asp Pro Trp Gly Ile Ile Asp Phe Leu His His Lys Ile Gly Thr Thr			50
	405	410	415
His Val Ala His His Phe Asp Ser Thr Ile Pro His Tyr Lys Ala Gln			55
	420	425	430
Ile Ala Thr Asp Ala Ile Lys Ala Lys Phe Pro Glu Val Tyr Leu Tyr			60
	435	440	445
Asp Pro Thr Pro Ile Pro Gln Ala Met Trp Arg Val Ala Lys Gly Cys			
	450	455	460
Thr Ala Val Glu Gln Arg Gly Asp Ala Trp Val Trp Lys Asn Glu Gly			65

DE 101 02 337 A 1

	465	470	475	480
5	Ile Glu Asp Leu Val Glu His Arg Gln Ser Lys Leu Ser Ser Glu			
		485	490	495
10	<210> 7			
	<211> 1578			
	<212> DNA			
	<213> Physcomitrella patens			
15	<220>			
	<221> CDS			
20	<222> (1)..(1578)			
	<400> 7			
	atg gta ttc gcg ggc ggt gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac			48
25	Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn			
	1	5	10	15
	atc gac gtc gag cac att gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc			96
30	Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe			
	20	25	30	
	agt tat gtg tct tca act gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa			144
35	Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln			
	35	40	45	
	cct ttg aag cgc ctg acg agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc			192
40	Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala			
	50	55	60	
	gtg caa tgt ata tca gct gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga			240
45	Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly			
	65	70	75	80
	act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg			288
50	Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg			
	85	90	95	
	tca tct cag tgg aag aag tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta			336
55	Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val			
	100	105	110	
60	cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat			384
	His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr			
65	115	120	125	

DE 101 02 337 A 1

gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt	432	
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser		
130 135 140		5
act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca	480	
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala		
145 150 155 160		10
gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag	528	
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu		
165 170 175		15
agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga	576	
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg		
180 185 190		20
gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat	624	
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr		
195 200 205		25
gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca	672	
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala		
210 215 220		30
ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt	720	
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys		
225 230 235 240		35
atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt	768	
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe		
245 250 255		40
ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg	816	
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly		
260 265 270		45
tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag	864	
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys		
275 280 285		50
gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act	912	
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr		
290 295 300		55
tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg	960	
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp		
305 310 315 320		60
		65

DE 101 02 337 A 1

	agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc	1008
	Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile	
5	325 330 335	
	ctc caa tac cag cat ctg ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt	1056
	Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg	
10	340 345 350	
	ggg agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc	1104
	Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu	
15	355 360 365	
	tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac	1152
	Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr	
20	370 375 380	
	ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca	1200
	Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro	
25	385 390 395 400	
	tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc	1248
	Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly	
30	405 410 415	
	ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct	1296
	Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser	
35	420 425 430	
	aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga	1344
	Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly	
40	435 440 445	
	aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag	1392
	Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu	
45	450 455 460	
	cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca	1440
	His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala	
50	465 470 475 480	
	cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac	1488
	Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp	
55	485 490 495	
	gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa	1536
	Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu	
60	500 505 510	
65		

DE 101 02 337 A 1

gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc acc agt taa 1578
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
515 520 525 5

<210> 8
<211> 525 10
<212> PRT
<213> Physcomitrella patens

<400> 8 15
Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
1 5 10 15
Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe 20
20 25 30
Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln 25
35 40 45
Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala 30
50 55 60
Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly 35
65 70 75 80
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg 40
85 90 95
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val 40
100 105 110
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr 45
115 120 125
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser 50
130 135 140
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala 55
145 150 155 160
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu 60
165 170 175
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg 60
180 185 190
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr 65

DE 101 02 337 A 1

	195	200	205
5	Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala 210	215	220
10	Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys 225	230	235 240
15	Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe 245	250	255
20	Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly 260	265	270
25	Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys 275	280	285
30	Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr 290	295	300
35	Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp 305	310	315 320
40	Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile 325	330	335
45	Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg 340	345	350
50	Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu 355	360	365
55	Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr 370	375	380
60	Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro 385	390	395 400
65	Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly 405	410	415
	Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser 420	425	430
	Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly 435	440	445
	Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu		

DE 101 02 337 A 1

450	455	460	
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala			5
465	470	475	480
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp			10
	485	490	495
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu			15
	500	505	510
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser			20
	515	520	525
<210> 9			
<211> 873			
<212> DNA			25
<213> Physcomitrella patens			
<220>			30
<221> CDS			
<222> (1)..(873)			
<400> 9			35
atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg			48
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser			
1 5 10 15			40
cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat			96
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp			
20 25 30			45
acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc			144
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile			
35 40 45			50
gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg			192
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu			
50 55 60			55
tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg			240
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu			
65 70 75 80			60
ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg ttc tgt ttt gcg ctc agt			288
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser			
85 90 95			65

DE 101 02 337 A 1

	ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag gct att acc tgg cgg tac	336
	Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr	
5	100 105 110	
	tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa cat aaa gag atg gcg att	384
	Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile	
10	115 120 125	
	ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac gtg gaa ttc atg gat acc	432
	Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr	
15	130 135 140	
	gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg caa ata agc ttc ctc cac	480
	Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His	
20	145 150 155 160	
	gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct cat	528
	Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His	
25	165 170 175	
	cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca gga	576
	His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly	
30	180 185 190	
	gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt cga	624
	Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg	
35	195 200 205	
	agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac ttg	672
	Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu	
40	210 215 220	
	aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct tac	720
	Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr	
45	225 230 235 240	
	tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att	768
	Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile	
50	245 250 255	
	ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac	816
	Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr	
55	260 265 270	
	gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa	864
	Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys	
60	275 280 285	
65		

DE 101 02 337 A 1

act gag tga

873

Thr Glu

290

5

<210> 10

<211> 290

10

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 10

15

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
20 25 30

20

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
35 40 45

25

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
50 55 60

30

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
65 70 75 80

35

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
85 90 95

40

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
115 120 125

45

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
130 135 140

50

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
145 150 155 160

55

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
165 170 175

60

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
180 185 190

65

DE 101 02 337 A 1

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
195 200 205

5 Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
210 215 220

10 Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
225 230 235 240

15 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
245 250 255

20 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
275 280 285

25 Thr Glu
290

30

<210> 11
<211> 1526
<212> DNA
35 <213> Phaeodactylum tricornutum

<220>
40 <221> CDS
<222> (92)..(1402)

<400> 11
45 gcttccgtta gcgtcccata gtttgttaca cttggctgtg aaacgaatac gttcttggtc 60

tacttactac aacgaagcaa ccaccagcag c atg ggt aag gga ggt caa cga 112
Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg
50 1 5

gct gta gct ccc aag agt gcc acc agc tct act ggc agt gct acc ctt 160
55 Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu
10 15 20

agc caa agc aag gaa cag gta tgg act tcg tcg tac aac cct ctg gcg 208
60 Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala
25 30 35

aag gat tcc ccg gag ctg cca acc aaa ggc caa atc aag gcc gtc att 256
65 Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile

DE 101 02 337 A 1

40	45	50	55		
ccg aag gaa tgt ttc caa cgc tca gcc ttt tgg tct acc ttc tac ctg	304				5
Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu					
60 65 70					
atg cgc gat ctc gcc atg gct gcc gcc ttt tgc tac gga acc tca cag	352				10
Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala Phe Cys Tyr Gly Thr Ser Gln					
75 80 85					
gtc ctc tcc acc gac ctt ccc caa gac gcc acg ctc att ctg ccc tgg	400				15
Val Leu Ser Thr Asp Leu Pro Gln Asp Ala Thr Leu Ile Leu Pro Trp					
90 95 100					
gct ctc ggc tgg ggc gtc tac gcc ttt tgg atg gga acc att ctc acc	448				20
Ala Leu Gly Trp Gly Val Tyr Ala Phe Trp Met Gly Thr Ile Leu Thr					
105 110 115					
ggg cct tgg gta gtt gcg cac gaa tgt gga cac ggc gct tac tcc gac	496				25
Gly Pro Trp Val Val Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Tyr Ser Asp					
120 125 130 135					
tcc cag acg ttc aat gac gtg gtc ggc ttt atc gtc cac caa gct ttg	544				30
Ser Gln Thr Phe Asn Asp Val Val Gly Phe Ile Val His Gln Ala Leu					
140 145 150					
ctc gtc ccc tac ttt gcc tgg cag tac acc cac gcg aaa cac cac cgt	592				35
Leu Val Pro Tyr Phe Ala Trp Gln Tyr Thr His Ala Lys His His Arg					
155 160 165					
cga acc aac cat ctg gtg gac ggc gag tcc cac gtc cct tct acc gcc	640				40
Arg Thr Asn His Leu Val Asp Gly Glu Ser His Val Pro Ser Thr Ala					
170 175 180					
aag gat aac ggc ctc ggg ccg cac aac gag cga aac tcc ttc tac gcc	688				45
Lys Asp Asn Gly Leu Gly Pro His Asn Glu Arg Asn Ser Phe Tyr Ala					
185 190 195					
gcg tgg cac gag gcc atg gga gac ggc gcc ttt gcc gtc ttt caa gtc	736				50
Ala Trp His Glu Ala Met Gly Asp Gly Ala Phe Ala Val Phe Gln Val					
200 205 210 215					
tgg tgc cac ttg ttc gtc ggc tgg cct ctc tac ttg gcc ggt ctg gcc	784				55
Trp Ser His Leu Phe Val Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Gly Leu Ala					
220 225 230					
agt acc gga aag ctt gcg cac gaa ggt tgg tgg ctg gaa gaa cgg aac	832				60
Ser Thr Gly Lys Leu Ala His Glu Gly Trp Trp Leu Glu Glu Arg Asn					
					65

DE 101 02 337 A 1

	235	240	245	
5	gcg att gcg gat cac ttt cga ccc agc tct ccc atg ttc ccc gcc aag Ala Ile Ala Asp His Phe Arg Pro Ser Ser Pro Met Phe Pro Ala Lys	880		
	250	255	260	
10	atc cgt gcc aag att gcc ctt tcc agc gcg acg gaa ctc gcc gtg ctc Ile Arg Ala Lys Ile Ala Leu Ser Ser Ala Thr Glu Leu Ala Val Leu	928		
	265	270	275	
15	gct gga ctc ttg tat gtc ggt aca cag gtc gga cac ctt ccc gtc ctg Ala Gly Leu Leu Tyr Val Gly Thr Gln Val Gly His Leu Pro Val Leu	976		
	280	285	290	295
20	ctg tgg tac tgg gga ccg tac acc ttt gtc aac gct tgg ctt gta ctc Leu Trp Tyr Trp Gly Pro Tyr Thr Phe Val Asn Ala Trp Leu Val Leu	1024		
	300	305	310	
25	tac acg tgg ctg cag cat acg gac ccg tcc atc ccg cac tac ggt gaa Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Pro Ser Ile Pro His Tyr Gly Glu	1072		
	315	320	325	
30	ggc gag tgg acc tgg gtc aag ggc gcg ctc tct acc att gat cga gac Gly Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp	1120		
	330	335	340	
35	tac ggc atc ttc gat ttc ttt cac cac acc atc ggt tcc acg cac gtg Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His Thr Ile Gly Ser Thr His Val	1168		
	345	350	355	
40	gta cac cat ttg ttc cac gaa atg ccc tgg tac aat gcc ggc att gcc Val His His Leu Phe His Glu Met Pro Trp Tyr Asn Ala Gly Ile Ala	1216		
	360	365	370	375
45	acg caa aag gtc aag gaa ttt ttg gaa ccc cag ggc ttg tac aat tac Thr Gln Lys Val Lys Glu Phe Leu Glu Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Tyr	1264		
	380	385	390	
50	gat ccg acc ccc tgg tac aag gcc atg tgg cgc att gcc cgg acc tgt Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Lys Ala Met Trp Arg Ile Ala Arg Thr Cys	1312		
	395	400	405	
55	cac tat gtg gag tca aac gag ggt gtg cag tat ttc aag agt atg gaa His Tyr Val Glu Ser Asn Glu Gly Val Gln Tyr Phe Lys Ser Met Glu	1360		
	410	415	420	
60	aac gtg ccg ctg act aag gat gtg cga aac aaa gcc gca tga Asn Val Pro Leu Thr Lys Asp Val Arg Asn Lys Ala Ala	1402		

DE 101 02 337 A 1

425	430	435	
gaaaaagtgc caccgacgca taattttaca atcctaccaa caagaccaac attatatggt 1462			5
tttcgcttaa aagatagttt tttctacat ctgtgtagtc ggcacaaaaa aaaaaaaaaa 1522			
aaaa			10
<210> 12			
<211> 436			15
<212> PRT			
<213> Phaeodactylum tricornutum			
<400> 12			20
Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser			
1 5 10 15			
Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr			25
20 25 30			
Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys			30
35 40 45			
Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala			35
50 55 60			
Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala			40
65 70 75 80			
Phe Cys Tyr Gly Thr Ser Gln Val Leu Ser Thr Asp Leu Pro Gln Asp			45
85 90 95			
Ala Thr Leu Ile Leu Pro Trp Ala Leu Gly Trp Gly Val Tyr Ala Phe			50
100 105 110			
Trp Met Gly Thr Ile Leu Thr Gly Pro Trp Val Val Ala His Glu Cys			55
115 120 125			
Gly His Gly Ala Tyr Ser Asp Ser Gln Thr Phe Asn Asp Val Val Gly			60
130 135 140			
Phe Ile Val His Gln Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ala Trp Gln Tyr			65
145 150 155 160			
Thr His Ala Lys His His Arg Arg Thr Asn His Leu Val Asp Gly Glu			70
165 170 175			

DE 101 02 337 A 1

	Ser	His	Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Lys	Asp	Asn	Gly	Leu	Gly	Pro	His	Asn	
				180					185					190			
5	Glu	Arg	Asn	Ser	Phe	Tyr	Ala	Ala	Trp	His	Glu	Ala	Met	Gly	Asp	Gly	
			195					200					205				
10	Ala	Phe	Ala	Val	Phe	Gln	Val	Trp	Ser	His	Leu	Phe	Val	Gly	Trp	Pro	
		210					215					220					
	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Ser	Thr	Gly	Lys	Leu	Ala	His	Glu	Gly	
15	225					230					235					240	
	Trp	Trp	Leu	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Ile	Ala	Asp	His	Phe	Arg	Pro	Ser	
20					245					250					255		
	Ser	Pro	Met	Phe	Pro	Ala	Lys	Ile	Arg	Ala	Lys	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	
				260					265					270			
25	Ala	Thr	Glu	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Tyr	Val	Gly	Thr	Gln	
			275					280						285			
30	Val	Gly	His	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Tyr	Thr	Phe	
		290					295					300					
	Val	Asn	Ala	Trp	Leu	Val	Leu	Tyr	Thr	Trp	Leu	Gln	His	Thr	Asp	Pro	
35	305					310					315					320	
	Ser	Ile	Pro	His	Tyr	Gly	Glu	Gly	Glu	Trp	Thr	Trp	Val	Lys	Gly	Ala	
40					325					330					335		
	Leu	Ser	Thr	Ile	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Ile	Phe	Asp	Phe	Phe	His	His	
45				340					345					350			
	Thr	Ile	Gly	Ser	Thr	His	Val	Val	His	His	Leu	Phe	His	Glu	Met	Pro	
		355						360					365				
50	Trp	Tyr	Asn	Ala	Gly	Ile	Ala	Thr	Gln	Lys	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	
		370					375					380					
55	Pro	Gln	Gly	Leu	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Pro	Thr	Pro	Trp	Tyr	Lys	Ala	Met	
	385					390					395					400	
	Trp	Arg	Ile	Ala	Arg	Thr	Cys	His	Tyr	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Gly	Val	
60				405						410					415		
	Gln	Tyr	Phe	Lys	Ser	Met	Glu	Asn	Val	Pro	Leu	Thr	Lys	Asp	Val	Arg	
65				420					425					430			

DE 101 02 337 A 1

Asn Lys Ala Ala
435

<210> 13

<211> 3598

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
pUC19 dar

<400> 13

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agtcctcga 420

gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgttttt gttttactat 480

gtgtgttatg tatttgatgt gcgataaatt tttatatgtg gtactaaatt tataacacct 540

tttatgctaa cgtttgcaa cacttagcaa ttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600

tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc 660

tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttaattgtt 720

gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780

taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttag taatttttca 840

agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900

ttaaaaatat ttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960

ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa ttacatgca actagttatg catgtagtct 1020

DE 101 02 337 A 1

atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
 5 taattttcttc atagccagcc caccgcggtg ggcggcgcc tgcagtctag aaggcctcct 1140
 gctttaatga gatatgagag acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt 1200
 10 gcacgttgta aaaaacctga gcatgtgtag ctacagatcct taccgccggt ttcggttcat 1260
 tctaataaat atatcaccgc ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt 1320
 15 tactgattgt ccgtcgacga attcgagctc ggcgcgcaa gcttggcgta atcatgggtca 1380
 tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctacacaattc cacacaacat acgagccgga 1440
 20 agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg 1500
 cgctcactgc ccgctttcca gtccggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc 1560
 25 caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt ggcgcgtctt ccgcttcctc gctcactgac 1620
 tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggttaata 1680
 30 cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 1740
 aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 1800
 35 gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa 1860
 40 agataaccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gaccctgccg 1920
 cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 1980
 45 cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa 2040
 cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaaccg 2100
 50 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 2160
 tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg 2220
 55 acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 2280
 tcttgatccg gcaacaaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag 2340
 60 attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 2400
 65 gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc 2460

DE 101 02 337 A 1

ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agtttttaaat caatctaaag tatatatgag	2520	
taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt	2580	5
ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag	2640	
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgagag acccacgctc accggtcca	2700	10
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact	2760	
ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca	2820	15
gttaatagtt tgcgcaacgt tggtgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg	2880	
tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc	2940	20
atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttggtcag aagtaagttg	3000	
gccgcagtgt tatcactcat gggtatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca	3060	25
tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt	3120	
atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc	3180	30
agaactttta aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc	3240	35
ttaccgctgt tgagatccag ttogatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca	3300	
tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa	3360	40
aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat	3420	
tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa	3480	45
aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa	3540	
accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc	3598	50
<210> 14		55
<211> 3590		
<212> DNA		
<213> Unknown		60
<220>		
<223> Sequenz stellt eine pflanzliche		
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor		65

DE 101 02 337 A 1

pUC19 dar

<400> 14

5 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
10 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
15 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
20 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgttttt gttttactat 480
25 gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatattg gtactaaatt tataacacct 540
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagt gattaattga ttctaaatta 600
30 tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatttc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttgagga ttttaattgtt 720
35 gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
40 taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
45 ttaaaaaatat tttggaaatg atttgcattg aagccatgtg taaaacatg acatccactt 960
ggaggatgca ataatagaaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
50 atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taattttctt atagccagcg gatccgatat cgggcccgt agcgtttaacc ctgctttaat 1140
gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg 1200
60 taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccggcg gtttcggttc attctaataga 1260
atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa tttactgatt 1320
65 gtccgtcgac gaattcgagc tcggcgcgcc aagcttggcg taatcatggt catagctgtt 1380

DE 101 02 337 A 1

tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa	1440	
gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact	1500	5
gcccgttttc cagtccggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc	1560	
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg	1620	10
ctcggtcgtt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc	1680	
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaagccagc aaaaggccag	1740	15
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt ttcccatagg ctccgcccc ctgacgagca	1800	
tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca	1860	20
ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg	1920	
atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag	1980	25
gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt	2040	
tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca	2100	30
cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg	2160	
cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt	2220	35
tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaata agagttggtg gctcttgatc	2280	
cggcaaaaca accaccgctg gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg	2340	40
cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagt	2400	
gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta	2460	45
gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg	2520	
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg	2580	50
ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc	2640	
atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc	2700	55
agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc	2760	
ctccatccag tctattaatt gttgcgggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag	2820	60
		65

DE 101 02 337 A 1

tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat 2880
 5 ggcttcattc agctccggtt cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg 2940
 caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt 3000
 10 gttatcactc atgggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 3060
 atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 3120
 15 accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 3180
 aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 3240
 20 gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac 3300
 tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaat 3360
 aaggcgaca cggaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat 3420
 30 ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca 3480
 aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat 3540
 35 tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc 3590

 40 <210> 15
 <211> 3584
 <212> DNA
 <213> Unknown
 45
 <220>
 <223> Sequenz stellt eine pflanzliche
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
 50 pUC19 dar

 <400> 15
 55 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 60 ttggcgggtg tcggggcttg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
 65 attogccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300

DE 101 02 337 A 1

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360	
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctcga	420	5
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgttttt gttttactat	480	
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatattg gtactaaatt tataacacct	540	10
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa ttgcaagtt gattaattga ttctaaatta	600	
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc	660	15
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattgtt	720	
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg	780	20
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca	840	
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt	900	25
ttaaaaaat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt	960	30
ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa ttacatgca actagttatg catgtagtct	1020	
atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta	1080	35
taattttctt atagccagca gatctgccg catcgatccc gggccatggc ctgctttaat	1140	
gagatatgag agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg	1200	40
taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg gtttcgggtt attctaata	1260	
atataatcacc cgttactatc gtattttttat gaataatatt ctccgttcaa ttactgatt	1320	45
gtccgtcgac gagctcggcg cgccaagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt	1380	
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa	1440	50
agcctggggg gcctaataag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc	1500	
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag	1560	55
aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcgcgc actgactcgc tgcgctcgg	1620	
cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga	1680	60
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg	1740	65

DE 101 02 337 A 1

taaaaaggcc gcgttgctgg cgttttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 1800
 5 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggtt 1860
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1920
 10 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980
 cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040
 15 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 2100
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc 2160
 20 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280
 25 acaaaccacc gctggtagcg gtgggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2340
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 2400
 30 aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 2520
 cagttaccaaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 2580
 40 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 2700
 45 aaaccagcca gccggaaggc ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 2760
 ccagtctatt aattgttgcc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820
 50 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2880
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2940
 55 agcggttagc tccttcgggc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 3000
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3120
 65 ttgctcttgc ccggcgtaaa tacgggataa taccgogcca catagcagaa ctttaaaagt 3180

DE 101 02 337 A 1

gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3240

atccagttcg atgtaaccca ctcggtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300 5

cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420 10

gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480

ggttcgcgcg acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540 15

gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 3584

20

<210> 16

<211> 4507

<212> DNA 25

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche 30

Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor

pUC19 dar

35

<400> 16

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120 40

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggcgc 240 45

attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat 300

tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360 50

ttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agtcctcga 420

gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgTTTT gttttactat 480 55

gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt ttatatattg gtactaaatt tataacacct 540 60

tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa ttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600

ttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc 660 65

DE 101 02 337 A 1

tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattggt 720

5 gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780

taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840

10 agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900

ttaaaaatat tttggaaatg atttgcattg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960

15 ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa ttacatgca actagttatg catgtagtct 1020

atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080

20 taattttcttc atagccagcc caccgogggtg ggcgcccgcc tgcagtctag aaggcctcct 1140

gctttaatga gatatgagac acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt 1200

25 gcaogttgta aaaaacctga gcatgtgtag ctgagatcct taccgccggt ttcggttcat 1260

tctaataaat atatcacccg ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt 1320

30 tactgattgt ccgtcgagca aatttacaca ttgccactaa acgtctaaac ccttgtaatt 1380

tgtttttggt ttactatgtg tgttatgtat ttgatttgcg ataaattttt atatttggt 1440

ctaaatttat aacacctttt atgctaacgt ttgccaacac ttagcaattt gcaagttgat 1500

40 taattgattc taaattattt ttgtcttcta aatacatata ctaatcaact ggaaatgtaa 1560

atatttgcta atatttctac tataggagaa ttaaagttag tgaatatggt accacaaggt 1620

45 ttggagattt aattggtgca atgctgcatg gatggcatat acaccaaaaca ttcaataatt 1680

cttgaggata ataatggtac cacacaagat ttgaggtgca tgaacgtcac gtggacaaaa 1740

50 ggtttagtaa tttttcaaga caacaatggt accacacaca agttttgagg tgcattgcat 1800

gatgccctgt ggaaagttta aaaatatttt ggaaatgatt tgcattggaag ccatgtgtaa 1860

55 aaccatgaca tccacttgga ggatgcaata atgaagaaaa ctacaaattt acatgcaact 1920

agttatgcat gtagtctata taatgaggat ttgcaatac tttcattcat acacactcac 1980

60 taagttttac acgattataa tttcttcata gccagcggat ccgatatcgg gcccgctagc 2040

65 gttaaccctg ctttaatgag atatgagaga cgcctatgat cgcattgatat ttgctttcaa 2100

DE 101 02 337 A 1

tctgtgtgtg cacgttgtaa aaaacctgag catgtgtagc tcagatcctt accgccgggtt	2160	
tcggttcatt ctaatgaata tatcaccggt tactatcgta tttttatgaa taatattctc	2220	5
cgttcaattt actgattgtc cgtcgacgaa ttcgagctcg gcgcgccaag cttggcgtaa	2280	
tcatggcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata	2340	10
cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta	2400	
attgcgttgc gtcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa	2460	15
tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcgggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg	2520	
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag	2580	20
gcggtaatat ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	2640	
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc	2700	25
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca	2760	
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg	2820	30
acctgccgc ttaccggata cctgtccgc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct	2880	35
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt	2940	
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag	3000	40
tccaacccg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc	3060	
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	3120	45
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	3180	
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtgggtt tttgtttgc	3240	50
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	3300	
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcag gagattatca	3360	55
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	3420	
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca	3480	60
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg	3540	65

DE 101 02 337 A 1

atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 3600
 5 ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc 3660
 cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt 3720
 10 agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca 3780
 cgctcgctgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 3840
 15 tgatccccc tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcttcgat cgttgtcaga 3900
 agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 3960
 20 gtcattgccat ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga 4020
 gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgtct tggccggcgt caatacggga taataccgcg 4080
 25 ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 4140
 tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 4200
 30 tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat 4260
 gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 4320
 caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 4380
 40 atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 4440
 gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat caccaggccc 4500
 45 tttcgtc 4507

50 <210> 17
 <211> 5410
 <212> DNA
 <213> Unknown

55 <220>
 <223> Sequenz stellt eine pflanzliche
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
 60 pUC19 dar

<400> 17
 65 ttttggaat gatttgcatt gaagccatgt gtaaaacat gacatccact tggaggatgc 60

DE 101 02 337 A 1

aataatgaag aaaactacaa atttacatgc aactagttat gcatgtagtc tatataatga	120	
ggattttgca atactttcat tcatacacac tcactaagtt ttacacgatt ataattttctt	180	5
catagccagc ggatccgata tcggggccgc tagcgttaac cctgctttaa tgagatatgc	240	
gagacgccta tgatcgcatg atatttgctt tcaattctgt tgtgcacgtt gtaaaaaacc	300	10
tgagcatgtg tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggtt cattctaattg aatatatcac	360	
ccgttactat cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtcga	420	15
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttggtttt gttttactat	480	
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatattg gtactaaatt tataaacacct	540	20
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa ttgcaagtt gattaattga ttctaaatta	600	
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatttc	660	25
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttgaga tttaattggt	720	
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg	780	30
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttag taatttttca	840	35
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt	900	
ttaaaaaat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt	960	40
ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa ttacatgca actagttatg catgtagtct	1020	
atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta	1080	45
taattttctt atagccagca gatctgccg catcgatccc ggccatggc ctgctttaat	1140	
gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg	1200	50
taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg gtttcgggtt attctaattga	1260	
atataatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa ttactgatt	1320	55
gtccgtogac gagctcggcg cgccaagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttctgt	1380	
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa	1440	60
agcctgggggt gcctaattgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc	1500	65

DE 101 02 337 A 1

tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 1560
 5 aggcgggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 1620
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 1680
 10 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1740
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 1800
 15 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggtt 1860
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1920
 20 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980
 cagttcgggtg taggtcgctt gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040
 25 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 2100
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 2160
 30 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2340
 40 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga 2400
 aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460
 45 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 2520
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac 2580
 50 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 2700
 55 aaaccagcca gccggaaggc ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat 2760
 ccagttctatt aattggtgcc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820
 60 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2880
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa 2940
 65

DE 101 02 337 A 1

agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 3000	
actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060	5
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3120	
ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180	10
gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3240	
atccagttcg atgtaaccca ctcggtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300	15
cagcgtttct gggtagagcaa aacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360	
gacacggaaa tggtgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420	20
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480	
ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540	25
gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga 3600	30
tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 3660	
ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 3720	35
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 3780	
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgccattcgc cattcaggct 3840	40
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggctcttctg ctattacgcc agctggcgaa 3900	
agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg 3960	45
ttgtaaaacg acggccagtg aattcggcgc gccgagctcc tcgagcaaatt ttacacattg 4020	
ccactaaacg tctaaaccct tgtaatttgt tttgttttta ctatgtgtgt tatgtatttg 4080	50
at ttgcgata aatttttata tttggtacta aatttataac accttttatg ctaacgtttg 4140	
ccaacactta gcaatttgca agttgattaa ttgattctaa attatttttg tcttctaaat 4200	55
acataacta atcaactgga aatgtaaata tttgctaata tttctactat aggagaatta 4260	60
aagtgagtga atatggtacc acaaggtttg gagatttaatt tgttgcaatg ctgcatggat 4320	
ggcatataca ccaaacattc aataattctt gaggataata atggtaccac acaagatttg 4380	65

DE 101 02 337 A 1

aggtgcatga acgtcacgtg gacaaaaggt ttagtaattt ttcaagacaa caatggtacc 4440
 5 acacacaagt tttgagggtgc atgcatggat gccctgtgga aagtttaaaa atattttgga 4500
 aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac catgacatcc acttggagga tgcaataatg 4560
 10 aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt tatgcatgta gtctatataa tgaggatttt 4620
 gcaatacttt cattcataca cactcactaa gttttacacg attataattt cttcatagcc 4680
 15 agcccaccgc ggtgggcggc cgctgcagt ctagaaggcc tcctgcttta atgagatatg 4740
 cgagacgcct atgatcgcat gatatttgct ttcaattctg ttgtgcacgt tgtaaaaaac 4800
 20 ctgagcatgt gtagctcaga tccttaccgc cggtttcggt tcattctaata gaatatatca 4860
 cccgttacta tcgtattttt atgaataata ttctccgttc aatttactga ttgtccgtcg 4920
 25 agcaaattta cacattgcc aataacgtct aaacccttgt aatttgtttt tgttttacta 4980
 tgtgtgttat gtatttgatt tgcgataaat ttttatattt ggtactaaat ttataacacc 5040
 30 ttttatgcta acgtttgcc aacttagca atttgcaagt tgattaattg attctaaatt 5100
 atttttgtct tctaaatata tataactaat aactggaaat gtaaataatt gctaataatt 5160
 35 ctactatagg agaattaaag tgagtgaata tggtagcaca aggtttggag atttaattgt 5220
 tgcaatgctg catggatggc atatacacca aacattcaat aattcttgag gataataatg 5280
 gtaccacaca agatttgagg tgcataaacg tcacgtggac aaaagggtta gtaatttttc 5340
 45 aagacaacaa tgttaccaca cacaagtttt gaggtgcatg catggatgcc ctgtggaaag 5400
 tttaaaaata 5410

50

<210> 18

<211> 648

55 <212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

60 <221> CDS

<222> (1) .. (648)

65 <220>

DE 101 02 337 A 1

<223> .

<400> 18

tgg tgg aaa aac aag cac aac gga cac cac gcc gtc ccc aac ctc cac	48	5
Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His		
1 5 10 15		
tgc tcc tcc gca gtc gcg caa gat ggg gac ccg gac atc gat acc atg	96	10
Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met		
20 25 30		
ccc ctt ctc gcc tgg tcc gtc cag caa gcc cag tct tac cgg gaa ctc	144	15
Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu		
35 40 45		20
caa gcc gac gga aag gat tcg ggt ttg gtc aag ttc atg atc cgt aac	192	25
Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn		
50 55 60		
caa tcc tac ttt tac ttt ccc atc ttg ttg ctc gcc cgc ctg tcg tgg	240	30
Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp		
65 70 75 80		
ttg aac gag tcc ttc aag tgc gcc ttt ggg ctt gga gct gcg tcg gag	288	35
Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu		
85 90 95		
aac gct gct ctc gaa ctc aag gcc aag ggt ctt cag tac ccc ctt ttg	336	40
Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu		
100 105 110		
gaa aag gct ggc atc ctg ctg cac tac gct tgg atg ctt aca gtt tcg	384	45
Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser		
115 120 125		
tcc ggc ttt gga cgc ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta	432	50
Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu		
130 135 140		
acc gcg acc gcg tcc tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc	480	55
Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu		
145 150 155 160		
ggc cac aac ggc atg gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc	528	60
Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe		
165 170 175		
tgg aag ctc caa gtc acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt	576	65

DE 101 02 337 A 1

Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly
180 185 190

5 ttc ccc caa gcc ttt gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa 624
Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln
195 200 205

10 gtc gac cac cac tta ttc ccc agc 648
Val Asp His His Leu Phe Pro Ser
210 215

15

<210> 19
20 <211> 216
<212> PRT
<213> Phaeodactylum tricornutum

25 <400> 19
Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His
1 5 10 15

30 Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met
20 25 30

35 Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu
35 40 45

40 Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn
50 55 60

45 Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu
85 90 95

50 Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu
100 105 110

55 Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser
115 120 125

60 Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu
130 135 140

65 Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu
145 150 155 160

DE 101 02 337 A 1

Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe
 165 170 175

Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly
 180 185 190

Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln
 195 200 205

Val Asp His His Leu Phe Pro Ser
 210 215

<210> 20

<211> 12093

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
 Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 20

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60

gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcac acagcgccag cagaatgccca 120

tagtgggcgg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180

ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240

atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300

ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaaa gtgtcaagca 360

tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420

gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt gggggttcag cagccggcgc 480

tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540

cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600

ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660

ccggcacgcg accgggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720

gcgaggcggg ttttccggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780

DE 101 02 337 A 1

ctgttggggc cgtgcttgag gaggagggcg ggcacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840
 5 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
 ccggtccgga cgcagcgctc gaggagggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960
 10 ggaggctcgt tgcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 15 ccaccgctc agacgcccgt agcagccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
 ccaagcctca cggccgctc cggcctctct ggccgccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
 20 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttc gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
 ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
 25 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgctttt tccataggct 1380
 ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
 30 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgcgct ctctgttcc 1500
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc cttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
 ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt 1620
 40 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
 45 ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 50 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgctcgc cagggtaca 1980
 55 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggccgcctc aatggcgacc 2040
 tgggccgctt gggcgccctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
 60 tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 65

DE 101 02 337 A 1

aacggccggg ggggtgcgct gattgccaaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc	2280	
gacttcgctg agctgggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc	2340	5
gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa	2400	
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata	2460	10
ccctcgcgaa aacttgcccc tcaactgacag atgaggggag gacgttgaca cttgaggggc	2520	
cgactcaccg ggccggcgct tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg	2580	15
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat	2640	
gatgtggaca agcctgggga taagtgccct gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac	2700	20
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc	2760	
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt	2820	25
ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat	2880	
aaaccttggt tttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg	2940	30
tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc	3000	35
tgcgccccct ggccgcgaac ggccctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca	3060	
ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca	3120	40
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg	3180	
gcggccctgg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg	3240	45
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcggtt gccgtgctcg	3300	
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag	3360	50
gtatgaaaac gagaattgga cttttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag	3420	
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa	3480	55
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg	3540	
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact	3600	60
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata	3660	65

DE 101 02 337 A 1

attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720

5 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780

gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840

10 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900

cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960

15 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgtggc 4020

gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080

20 tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140

cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgccgg catccaacgc cattcatggc 4200

25 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260

ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320

30 acccaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380

agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440

35 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500

aaaagctgtt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560

cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620

45 taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680

gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctggtggg agaaaatgaa 4740

50 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800

gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860

55 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cttttgctcg 4920

gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980

60 aggccttttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040

65 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100

DE 101 02 337 A 1

gaagaagaca ctccatttaa agatccgcg	gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag	5160
cccgaagagg aacttgctt ttcccacggc	gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa	5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt	gggagaagcg gcagggcgga caagtggtat	5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg	gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag	5340
ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct	gattgggaga aaataaaata ttatatTTTta	5400
ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg	gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg	5460
caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTg	ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt	5520
gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg	caagattcgg aataccaagt acgagaagga	5580
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat	tgccgataag gtggattatc tggacaccaa	5640
ggcaccaggc gggTcaaTc aggaataagg	gcacattgcc cggcggtgag tcggggcaat	5700
cccgcaagga gggTgaatga atcggacgtt	tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat	5760
cgacgcgggg tttccgccg aggatgccga	aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc	5820
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc	gatggTccag caagctacgg ccaagatcga	5880
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc	cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg	5940
ttcgcgtcgt ctcgaaacagg aggcggcagg	tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg	6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac	cgccggcgag gacctggcaa aacaggTcag	6060
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca	cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct	6120
ttccttgTtc gatattgcgc cgtggccgga	cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc	6180
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa	gaaaatcccg cgcgaggcg tgcaaaacaa	6240
ggTcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa	gatcacctac accggcgTcg agctgcgggc	6300
cgacgatgac gaactggTgt ggcagcaggt	gttgagTtac gcgaagcgca cccTatcgg	6360
cgagccgatc accttcacgt tctacagct	ttgccaggac ctgggctggT cgatcaatgg	6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct	gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc	ggtgtcgcTg ctgcaccgct tccgcgtcct	6540

DE 101 02 337 A 1

ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgac gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 5 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 ggcccgaagg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
 10 aaccttcgc ctcattgtgc gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga 6840
 15 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggtgca gttccggctg ggggttcagc 6900
 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 20 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
 25 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140
 cagcaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 30 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtg agcccgaaac gcgaggccga 7320
 35 ggggtcgccg gtatgctgct gcggcggtt ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatt 7440
 tcgctattct ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcgcgcg 7500
 45 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcattc ctgccgctc gctaggtagc 7560
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcgaa ctgcgggctt ggcgctgttg 7620
 50 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggcg 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740
 55 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttcagc agctttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 60 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgc actcgaacct 7920
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 65

DE 101 02 337 A 1

catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat	8040	
aggggagttg atatcgtaaa cggtcacttc taaagaaata ggcgcactca gcttcctcag	8100	5
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca	8160	
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata	8220	10
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga	8280	
tcatccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat	8340	15
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct	8400	
gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctgtt ggctggctgg	8460	20
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg	8520	
gacgttttta atgtactggg gtgggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat	8580	25
tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca	8640	30
gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa	8700	
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa	8760	35
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg	8820	
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa	8880	40
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaacg tggcgagaaa	8940	
ggaaggggaag aaagcgaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	9000	45
gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	9060	
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	9120	50
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca	9180	
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt	9240	55
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta	9300	60
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct	9360	
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	9420	65

DE 101 02 337 A 1

tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagtct 9480

5 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540

ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600

10 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660

agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg 9720

15 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780

gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840

20 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900

tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960

25 agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020

ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080

30 ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccacccaagc ggccggagaa 10140

cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200

35 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260

agtggagcat ttttgacaag aaatatattgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320

acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380

45 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaacgg cttgtccgc 10440

gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatgac ttgatccct 10500

50 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560

cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620

55 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcgtt 10680

ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740

60 actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgcctgagt gcttgcgga 10800

65 gcgtgaagct tgcatgcctg caggtcgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860

DE 101 02 337 A 1

attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta	10920	
tttgatttgc gataaat tttt tatatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacg	10980	5
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct	11040	
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga	11100	10
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat	11160	
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga	11220	15
tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt	11280	
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt	11340	20
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat	11400	
aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga	11460	25
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattata atttcttcat	11520	
agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggccctcctgc tttaatgaga	11580	30
tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa	11640	
aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgcgcggtt cggttcattc taatgaatat	11700	35
atcacccgtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc	11760	40
gtcgacgaat tcgagctcgg cgcgcctcta gaggatcgat gaattcagat cggctgagtg	11820	
gtcctttcaa cgttgcggtt ctgtcagttc caaacgtaaa acggcttgtc ccgcgtcatc	11880	45
ggcggggggtc ataacgtgac tcccttaatt ctccgctcat gatcagattg tcgtttcccg	11940	
ccttcagttt aaactatcag tgtttgacag gatatattgg cgggtaaacc taagagaaaa	12000	50
gagcgtttat tagaataatc ggatatttaa aagggcgtga aaagggttat ccttcgtcca	12060	
tttgtatgtg catgccaacc acagggttcc cca	12093	55
<210> 21		60
<211> 12085		
<212> DNA		
<213> Unknown		65

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer

5 Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 21

10 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcac acagcgccag cagaatgcc 120
 15 tagtggggcg tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgctcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 20 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgtt ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaaa gtgtcaagca 360
 25 tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt ggggggttcag cagccggcgc 480
 30 ttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 35 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
 ccggcacgcg accggggcga ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
 40 gcgaggcggg ttttccggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcgcca 840
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
 45 ccggtccgga cgcagcgctc gagcagggac tcgcggtgat tgatgatgga ttggcgaaaa 960
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
 55 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
 ccaccgcgtc agacgcccgt agcagccgcg tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
 60 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgctc gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
 65

DE 101 02 337 A 1

ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaagaaca tgtgagcaaa	1320	
agggcagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1380	5
ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac	1440	
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctctgtttcc	1500	10
gaccctgccg cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt	1560	
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt	1620	15
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac	1680	
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca	1740	20
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg	1800	
ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga	1860	25
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa	1920	
agggcgccgg gcccgcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggtaca	1980	30
aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggccgcgcatc aatggcgacc	2040	35
tgggcccctt gggcgccctg ctgaaactct ggctcaccga cgacccgcgc acggcgcggt	2100	
tcggtgatgc cacgatctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg	2160	40
gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa	2220	
aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc	2280	45
gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc	2340	
gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa	2400	50
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata	2460	
cctcgcgga aacttgcccc tctactgacag atgaggggcg gacgttgaca cttgaggggc	2520	55
cgactcacc gccgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg	2580	
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat	2640	60
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac	2700	65

DE 101 02 337 A 1

tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 5 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 10 aaaccttggtt ttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000
 15 tgcgccccctc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
 ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 20 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cctttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
 25 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaga ttataccgag 3360
 30 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 40 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
 tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 45 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 50 gctgcctcag attcagggtt tgcgcgtcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcatata gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 55 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
 60 gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 65 tgccccgctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140

DE 101 02 337 A 1

cgtgttgagg ccaacgccc	taatgcgggc	tgttgcccg	catccaacgc	cattcatggc	4200	
catatcaatg attttctggt	gcgtaccggg	ttgagaagcg	gtgtaagtga	actgcagttg	4260	5
ccatgtttta cggcagtgag	agcagagata	gcgctgatgt	ccggcgggtgc	ttttgccgtt	4320	
acgcaccacc ccgtcagtag	ctgaacagga	gggacagctg	atagacacag	aagccactgg	4380	10
agcacctcaa aaacaccatc	atacactaaa	tcagtaagtt	ggcagcatca	cccataattg	4440	
tggtttcaaa atcggctccg	tcgatactat	gttatacgcc	aactttgaaa	acaactttga	4500	15
aaaagctggt ttctggtatt	taaggtttta	gaatgcaagg	aacagtgaat	tggagttcgt	4560	
cttgttataa ttagcttctt	ggggtatctt	taaatactgt	agaaaagagg	aaggaaataa	4620	20
taaatggcta aaatgagaat	atcaccggaa	ttgaaaaaac	tgatcgaaaa	ataccgctgc	4680	25
gtaaaagata cggaaggaat	gtctcctgct	aagggtatata	agctgggtggg	agaaaatgaa	4740	
aacctatatt taaaaatgac	ggacagccgg	tataaaggga	ccacctatga	tgtggaacgg	4800	30
gaaaaggaca tgatgctatg	gctggaagga	aagctgcctg	ttccaaagggt	cctgcacttt	4860	
gaacggcatg atggctggag	caatctgctc	atgagtggag	ccgatggcgt	cctttgctcg	4920	35
gaagagtatg aagatgaaca	aagccctgaa	aagattatcg	agctgtatgc	ggagtgcac	4980	
aggctctttc actccatcga	catatcggat	tgtccctata	cgaatagctt	agacagccgc	5040	40
ttagccgaat tggattactt	actgaataac	gatctggccg	atgtggattg	cgaaaactgg	5100	
gaagaagaca ctccatttaa	agatccgcgc	gagctgtatg	atTTTTTaaa	gacggaaaag	5160	45
cccgaagagg aacttgtctt	ttcccacggc	gacctgggag	acagcaacat	ctttgtgaaa	5220	
gatggcaaag taagtggctt	tattgatctt	gggagaagcg	gcagggcgga	caagtggtat	5280	50
gacattgcct tctgcgtccg	gtogatcagg	gaggatatcg	gggaagaaca	gtatgtcgag	5340	
ctatTTTTtg acttactggg	gatcaagcct	gattgggaga	aaataaaata	ttatatTTta	5400	55
ctggatgaat tgTTTTtagta	cctagatgtg	gcgcaacgat	gccggcgaca	agcaggagcg	5460	60
caccgacttc ttccgcatca	agtgttttgg	ctctcaggcc	gaggccacg	gcaagtatTT	5520	
gggcaagggg tcgctggtat	tcgtgcaggg	caagattcgg	aataccaagt	acgagaagga	5580	65

DE 101 02 337 A 1

cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 5 ggcaccaggc ggggtcaaatac aggaataaagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga ggggtgaatga atcggacggt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 10 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcggtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 15 ggcgcacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacgcggcg ccgtggagcg 5940
 ttcgctcgt ctcgaaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 20 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggcccggt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 25 ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 30 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc 6300
 cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
 35 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtc ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
 45 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcggac 6660
 50 ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 55 cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 60 agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 65 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020

DE 101 02 337 A 1

ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc	7080	
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag	7140	5
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc	7200	
ggcgctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtc tcaaacagga ggacggcccc	7260	10
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga	7320	
ggggtcggcg gtatgctgct gggggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc	7380	15
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatt	7440	
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgcggcg	7500	20
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgctct gctaggtagc	7560	
ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcgaa ctgcgggcgt ggcgctgttg	7620	25
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggcg	7680	30
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc	7740	
acctttaccg cctggcaact ggcgcccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt	7800	35
tttgatccgc caatccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc	7860	
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tgggtccggg ggatctcgc actcgaacct	7920	40
acagttgttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg	7980	
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat	8040	45
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag	8100	
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca	8160	50
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata	8220	
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga	8280	55
tcatccgtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat	8340	60
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggt	8400	
gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggtc gggagctgtt ggctggctgg	8460	65

DE 101 02 337 A 1

tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 5 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tggccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcacca 8640
 10 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 15 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
 20 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaac tggcgagaaa 8940
 ggaaggggaag aaagcgaaa ggcggggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 25 gatcgggtcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 30 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaattttt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 35 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctcgaa 9420
 45 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagtct 9480
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 50 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttcacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660
 55 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gactacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780
 60 gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 65 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900

DE 101 02 337 A 1

tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc	9960	
agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	10020	5
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag	10080	
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa	10140	10
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga	10200	
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc	10260	15
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga	10320	
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcgggc	10380	20
tgagtggctc cttcaacggt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaacgg cttgtccgc	10440	25
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgac ttgatccct	10500	
ggcccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttccaac	10560	30
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca	10620	
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctcttg cgcttgcgtt	10680	35
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg	10740	
actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcggca	10800	40
gcgtgaagct tgcattgctg caggctgacg gcgcgccgag ctccctcgagc aaatttacac	10860	
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta	10920	45
tttgatttgc gataaatttt tatatttggc actaaattta taacaccttt tatgctaacg	10980	
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt cttaaattatt tttgtcttct	11040	50
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga	11100	
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat	11160	55
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga	11220	60
tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggtttagta atttttcaag acaacaatgt	11280	
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt	11340	65

DE 101 02 337 A 1

1 tggaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 5 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatagagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagcattata atttcttcat 11520
 10 agccagcgga tccgatatcg ggcccgcctag cgtaaacctt gctttaatga gatatgcgag 11580
 acgcctatga tcgcatgata ttgcttttca attctgttgt gcacgttgta aaaaacctga 11640
 15 gcatgtgtag ctcatgcctt taccgccggt ttcggttcat tctaataaat atatcaccgg 11700
 ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760
 20 attcgagctc ggcgcgctc tagaggatcg atgaattcag atcggtcgag tggctccttc 11820
 aacgttgagg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg tcccgcgtca tcggcggggg 11880
 25 tcataacgtg actcccttaa ttctccgctc atgatcagat tgcgttttcc cgccttcagt 11940
 ttaaactatc agtggttgac aggatatatt ggccgggtaaa cctaagagaa aagagcggtt 12000
 30 attagaataa tcggatattt aaaagggcgt gaaaagggtt atccttcgtc catttgatg 12060
 35 tgcattgcaa ccacagggtt cccca 12085

<210> 22
 40 <211> 12079
 <212> DNA
 <213> Unknown

45 <220>
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
 Promotor-Terminator-Expressionskassette

50 <400> 22
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 55 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcca 120
 tagtggggcg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180
 60 ataatacaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 65 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaa gtgtcaagca 360

DE 101 02 337 A 1

tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggctcg	420	
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggtt gggggttcag cagccggcgc	480	5
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg	540	
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg	600	10
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg	660	
ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct	720	15
gcgaggcggg tttttcgcc ggggacgcc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca	780	
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca	840	20
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag	900	
ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa	960	25
ggaggctcgt tgcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc	1020	
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctccccctt	1080	30
ccaccgcgtc agacgcccg agcagccgc tacgggcttt ttcattgcct gccctagcgt	1140	
ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttcctc	1200	35
gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa	1260	
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa	1320	40
agccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1380	
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac	1440	45
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgtcgct ctctgttcc	1500	
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt	1560	50
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt	1620	
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttgg tgtatccaac	1680	55
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca	1740	
ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgca ggctggccgg	1800	60
		65

DE 101 02 337 A 1

ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 5 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
 10 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcac aatggcgacc 2040
 tgggcccctt gggcgccctg ctgaaactct ggctcaccga cgacccgcgc acggcgcggt 2100
 15 tcggtgatgc cagcatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 20 aacggccggg ggggtgcggt gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgcgg agctgggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 25 gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460
 30 cctcgcgaa aacttgcccc tcaactgacag atgaggggag gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcacc gccgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcttgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 40 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 45 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 50 aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccggcccc ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000
 55 tgccccctc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
 ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 60 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 65 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcattg 3240

DE 101 02 337 A 1

cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcggt gccgtgctcg	3300	
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag	3360	5
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag	3420	
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa	3480	10
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg	3540	
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaaact	3600	15
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata	3660	
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt	3720	20
tgtcatgcag ctccaccgat ttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt	3780	
gctgctcag attcaggtta tgccgctcaa ttcgctcgt atatcgcttg ctgattacgt	3840	25
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca	3900	
cgtcaaaggg tgacagcagg ctccataagac gcccagcgt cgcctatgtg cgttcaccga	3960	30
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaacagc cagcgctggc	4020	
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac	4080	
tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat	4140	40
cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc	4200	
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg	4260	45
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcggtgc ttttgccgtt	4320	
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg	4380	50
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg	4440	
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga	4500	55
aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt	4560	
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa	4620	60
taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc	4680	65

DE 101 02 337 A 1

gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctggtggg agaaaatgaa 4740
 5 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 10 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 15 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 20 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 25 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
 30 ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400
 ctggatgaat tgTTTTtagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTgg ctctcaggcc gaggccacg gcaagtattt 5520
 40 gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 45 ggcaccaggc gggTcaaTc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga gggTgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 50 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 55 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggccg ccgtggagcg 5940
 ttcgcgtcgt ctgaaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 60 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 65

DE 101 02 337 A 1

ttccttggtc gatattgctc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc	6180	
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa	6240	5
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc	6300	
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg	6360	10
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg	6420	
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480	15
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtc ctgcaccgct tccgcgtcct	6540	
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgac gacgaggaaa tcgtcgtgct	6600	20
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcggcgac	6660	
ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga	6720	25
aaccttcgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt	6780	
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggtcaatga	6840	30
tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc	6900	35
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc	6960	
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa	7020	40
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc	7080	
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag	7140	45
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctt gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc	7200	
ggcgccctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgttct tcaaacagga ggacggcccc	7260	50
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtg agcccgaaac gcgaggccga	7320	
ggggtcggcg gtatgctgct gcgggcgttg ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc	7380	55
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatat	7440	
tcgctattct ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg	7500	60
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgctct gctaggtagc	7560	65

DE 101 02 337 A 1

ccgatacgat tgatggcggg cctgggggct atttgcggaa ctgcggggcgt ggcgctgttg 7620
 5 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctg cagcgggcct ggcgggggag 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgttc 7740
 10 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt 7800
 ttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 15 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagtgtttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 20 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggg agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gtttcctcag 8100
 25 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagtcc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 30 ttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400
 40 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 45 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 50 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 55 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga 8880
 60 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaa cgggcgaacg tggcgagaaa 8940
 65 ggaaggggag aaagcgaaa gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000

DE 101 02 337 A 1

gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	9060	
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	9120	5
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca	9180	
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt	9240	10
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta	9300	
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct	9360	15
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	9420	
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct	9480	20
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg	9540	
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca	9600	25
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc ggccttgag cctggcgaac	9660	
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg	9720	30
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag	9780	
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg	9840	35
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag	9900	
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc	9960	40
agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	10020	
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag	10080	45
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa	10140	
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga	10200	50
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc	10260	
agtggagcat ttttgacaag aaatatattg tagctgatag tgaccttagg cgacttttga	10320	55
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc	10380	
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc	10440	60
		65

DE 101 02 337 A 1

gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgac ttgatccct 10500
5 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
10 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
15 actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcgga 10800
gcgtgaagct tgcattgctg caggctgacg gcgcgccgag ctccctgagc aaatttacac 10860
20 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt ttactatgt gtgttatgta 10920
tttgatttgc gataaatttt tatatttggc actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
25 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
30 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
35 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggtttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
45 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
ttttgcaata ctttcatcca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
50 agccagcaga tctgccggca tcgatcccg gccatggcct gctttaatga gatatgcgag 11580
acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt gcacgttgta aaaaacctga 11640
55 gcatgtgtag ctcatgcct taccgccggc ttcggttcat tctaataat atatcaccgc 11700
ttactatcgt atttttatga ataataattt ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760
60 gctcggcgcg cctctagagg atcgatgaat tcagatcggc tgagtggctc cttcaacgtt 11820
gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc gtcacggcg ggggtcataa 11880
65

DE 101 02 337 A 1

cgtgactccc ttaattctcc gctcatgata agattgtcgt ttcccgcctt cagttttaaac 11940
 tatcagtgtt tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaaaagagc gtttattaga 12000 5
 ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatcctt cgtccatttg tatgtgcatg 12060
 ccaaccacag ggttcccca 12079 10

 <210> 23
 <211> 13002 15
 <212> DNA
 <213> Unknown

 <220> 20
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit zwei
 Promotor-Terminator-Expressionskassetten
 25

 <400> 23
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120 30
 tagtgggagg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240 35
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaaa gtgtcaagca 360 40
 tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420 45
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacggtt ggggggttcag cagccggcgc 480
 ttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540 50
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660 55
 ccggcacggc accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttctct 720
 gcgaggcggg tttttcgcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780 60
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccc gcgacagcga tgccggcgag cgcggcgga 840 65

DE 101 02 337 A 1

ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgcgggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900

5 ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960

ggaggctcgt tgcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020

10 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080

ccaccgcgtc agacgcccggt agcagccgc tacgggcttt ttcatgccct gccctagcgt 1140

15 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccgccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200

gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260

20 ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320

aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380

25 ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440

aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc 1500

30 gaccctgccg cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560

ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccatcctttt 1620

35 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680

40 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740

ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgca ggctggccgg 1800

45 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860

agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920

50 agggggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggtaca 1980

aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040

55 tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100

tcggtgatgc cagcatctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160

60 gcaaggtcat gatggcggtg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220

65 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280

DE 101 02 337 A 1

gacttcgctg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc	2340	
gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa	2400	5
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata	2460	
cctcgcgga aacttgcccc tcaactgacag atgaggggag gacgttgaca cttgaggggc	2520	10
cgactcacc gccgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg	2580	
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat	2640	15
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac	2700	
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc	2760	20
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt	2820	
ccgcccgtt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat	2880	25
aaaccttgtt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg	2940	
tgccccctt tctcgaacct tcccgccccg ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc	3000	30
tgccccctt gccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca	3060	35
ttgcgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca	3120	
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg	3180	40
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg	3240	
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg	3300	45
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag	3360	
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag	3420	50
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa	3480	
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg	3540	55
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaaact	3600	60
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata	3660	
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt	3720	65

DE 101 02 337 A 1

tgtcatgcag ctccaccgat ttgagaacg acagcgactt cgtcccagc cgtgccaggt 3780
 5 gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttccgtcggt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 10 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
 15 gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
 tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
 20 cgtgttgagg ccaacgcccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
 25 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320
 acgcaccacc cgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
 30 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440
 35 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgc aactttgaaa acaactttga 4500
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
 40 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
 taaatggcta aaatgagaat atcaccgga ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
 45 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctgggtgg agaaaatgaa 4740
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 50 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 55 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 aggctctttc actccatcga catatcgat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 60 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 65 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaaa gacggaaaag 5160

DE 101 02 337 A 1

cccgagagg aacttgctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttggtgaaa	5220	
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat	5280	5
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag	5340	
ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta	5400	10
ctggatgaat tgTTTTagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg	5460	
caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTgg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt	5520	15
gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga	5580	
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa	5640	20
ggcaccaggc gggTcaaTc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat	5700	
cccgcaagga gggTgaatga atcggaagctt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat	5760	25
cgacgcgggg ttttcgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc	5820	30
gccccgcgaa acctccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga	5880	
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg	5940	35
ttcgcgtcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg	6000	
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag	6060	40
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct	6120	
ttccttgTtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc	6180	45
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa	6240	
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc	6300	50
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg	6360	
cgagccgata accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg	6420	55
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480	60
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct	6540	
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgata gacgaggaaa tcgtcgtgct	6600	65

DE 101 02 337 A 1

gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
 5 ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
 10 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga 6840
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
 15 agccagcgcct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
 20 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140
 25 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
 30 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agccgaaca gcgaggccga 7320
 ggggtcgccg gtatgctgct gggggcgctt cggcggggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
 35 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatat 7440
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgcgcg 7500
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcact ctgccgctct gctaggtagc 7560
 45 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcgga ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggcct ggcggggcg 7680
 50 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740
 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttcaggt agctttagt 7800
 55 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttcggg ggatctcgc actcgaacct 7920
 60 acagttgttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat 8040
 65

DE 101 02 337 A 1

aggggagttg atatcgtaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag	8100	
cggttttatac cagcgatttc ctattatgtc ggcatagtgc tcaagatcga cagcctgtca	8160	5
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata	8220	
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga	8280	10
tcatccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat	8340	
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct	8400	15
gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggctc gggagctgtt ggctggctgg	8460	
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg	8520	20
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat	8580	
tgcccttcac cgctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca	8640	25
gcaggcgaaa atcctgtttg atggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa	8700	
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa	8760	30
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg	8820	35
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa	8880	
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaaacg tggcgagaaa	8940	40
ggaaggggag aaagcgaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc	9000	
gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	9060	45
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	9120	
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca	9180	50
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt	9240	
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta	9300	55
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct	9360	60
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	9420	
tcggggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct	9480	65

DE 101 02 337 A 1

tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 5 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660
 10 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780
 15 gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
 20 tcccttcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
 agccacgata gccgcgctgc ctggtcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
 25 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
 ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
 30 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
 agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
 40 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
 tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
 45 gtcacggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcacgatc ttgatccct 10500
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
 50 cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
 55 ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgccgca 10800
 60 gcgtgaagct tgcatgcctg caggctgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
 65 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920

DE 101 02 337 A 1

tttgatttgc gataaatttt tataatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacg	10980	
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct	11040	5
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga	11100	
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat	11160	10
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga	11220	
tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt	11280	15
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt	11340	
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaacatgac atccacttgg aggatgcaat	11400	20
aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga	11460	
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat	11520	25
agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggcctcctgc tttaatgaga	11580	30
tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa	11640	
aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgccggttt cggttcattc taatgaatat	11700	35
atcacccgtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc	11760	
gtcgagcaaa tttacacatt gccactaaac gtctaaaccc ttgtaatttg tttttgtttt	11820	40
actatgtgtg ttatgtattt gatttgcgat aaatttttat atttggtact aaatttataa	11880	
caccttttat gctaacgttt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta	11940	45
aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aaatgtaaatt atttgctaatt	12000	
atttctacta taggagaatt aaagtgagtg aatatggtac cacaaggttt ggagatttaa	12060	50
ttgttgcaat gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat	12120	
aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg tttagtaatt	12180	55
tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgaggtg catgcatgga tgccctgtgg	12240	60
aaagtttaaa aatatttttg aaatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc	12300	
cacttgaggg atgcaataat gaagaaaact acaaatttac atgcaactag ttatgcatgt	12360	65

DE 101 02 337 A 1

agtctatata atgaggattt tgcaataactt tcattcatatc acactcacta agtttttacac 12420
 5 gattataaatt tcttcatagc cagcggatcc gatatcgggc ccgctagcgt taaccctgct 12480
 ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgttggtgca 12540
 10 cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagctc agatcccttac cgccgggttc gggttcattct 12600
 aatgaatata tcacccgtta ctatcgtatt tttatgaata atattctccg ttcaatttac 12660
 15 tgattgtccg tcgacgaatt cgagctcggc gcgcctctag aggatcgatg aattcagatc 12720
 ggctgagtgg ctccctcaac gttgcgggtc tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttggtc 12780
 20 cgcgtcatcg gcgggggtca taacgtgact cccttaattc tccgctcatg atcagattgt 12840
 cgtttcccg cttcagttta aactatcagt gtttgacagg atatattggc gggtaaacct 12900
 25 aagagaaaag agcggtttatt agaataatcg gatatttaaa agggcgtgaa aagggtttatc 12960
 cttcgtccat ttgtatgtgc atgccaacca cagggttccc ca 13002
 30

<210> 24
 35 <211> 13905
 <212> DNA
 <213> Unknown

40 <220>
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit drei
 Promotor-Terminator-Expressionskassetten

45 <400> 24
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 50 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcca 120
 tagtgggcgg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
 55 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 60 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 65 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacggtt ggggggttcag cagccggcgc 480

DE 101 02 337 A 1

tttactggca cttcaggaac aagcgggagc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg	540	
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg	600	5
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg	660	
ccggcacgcg accgggagca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct	720	10
gcgaggcggg tttttcgccc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca	780	
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca	840	15
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag	900	
ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggagc tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa	960	20
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc	1020	
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt	1080	25
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagcccg c tacgggcttt ttcatgccct gccctagcgt	1140	30
ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccgccttc tggcgctctt ccgcttcctc	1200	
gtcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa	1260	35
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa	1320	
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1380	40
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac	1440	
aggactataa agataccagg cgtttcccc c tggaagctcc ctcgtcgct ctctgttcc	1500	45
gacctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt	1560	
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt	1620	50
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac	1680	
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca	1740	55
ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg	1800	60
ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga	1860	
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa	1920	65

DE 101 02 337 A 1

aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
 5 aaatcacggg cgctcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040
 tgggcccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgacccgcgc acggcgcggt 2100
 10 tcggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 15 aacggccggg gggcgcgcgt gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 20 gacgtcacc gggctggttg ccctcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgccagaa acgcgcgcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460
 25 cctcgcggaa aacttgccc tctactgacag atgagggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 30 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 40 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820
 ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 45 aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc 3000
 50 tgcccccctc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca 3060
 ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 55 ttgacgtgcc gcagggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
 60 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
 65 tggtcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360

DE 101 02 337 A 1

gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag	3420	
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa	3480	5
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg	3540	
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact	3600	10
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata	3660	
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt	3720	15
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt	3780	
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt	3840	20
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca	3900	
cgtaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccacgct ccgcatagtg cgttcaccga	3960	25
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc	4020	
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac	4080	30
tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat	4140	35
cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgccgg catccaacgc cattcatggc	4200	
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg	4260	40
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt	4320	
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg	4380	45
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg	4440	
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga	4500	50
aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt	4560	
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa	4620	55
taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc	4680	
gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctggtggg agaaaatgaa	4740	60
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg	4800	65

DE 101 02 337 A 1

gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 5 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 10 aggtcttttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 15 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 20 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggagaaca gtatgtcgag 5340
 25 ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaata ttatatttta 5400
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 30 caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
 gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 35 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 ggcaccaggc gggtaaactc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
 cccgcaagga gggatgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 45 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 50 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg 5940
 ttcgcgtcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 55 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 60 ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
 65

DE 101 02 337 A 1

ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctcg agctgcgggc	6300	
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg	6360	5
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg	6420	
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480	10
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgctg ctgcaccgct tccgcgtcct	6540	
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgac gacgaggaaa tcgtcgtgct	6600	15
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgcgccgac	6660	
ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga	6720	20
aaccttcgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt	6780	
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggtcaatga	6840	25
tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggtca gttccggctg ggggttcagc	6900	
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc	6960	30
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa	7020	35
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc	7080	
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag	7140	40
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc	7200	
ggcgccatac tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc	7260	45
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtg agcccgaaca gcgaggccga	7320	
ggggtcgcg gtatgctgct gcgggcgtt cggcggggtt tattgctcgt gatgatcgtc	7380	50
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcatttca tcctcggcgc acttaatat	7440	
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg	7500	55
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcattc ctgccgctc gctaggtagc	7560	60
ccgatacgat tgatggcgg cctgggggct atttgcgga ctgcgggcgt ggcgctgttg	7620	
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg	7680	65

DE 101 02 337 A 1

gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740
 5 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggactttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 10 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 15 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
 20 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggg tctctgcgag ggagatgata 8220
 25 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 30 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctggt ggctggctgg 8460
 35 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 45 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagataggtg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactatataa 8760
 50 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgaa 8880
 55 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaagggaag aaagcgaaag gagcgggccc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 60 gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 65

DE 101 02 337 A 1

aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca	9180	
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt	9240	5
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta	9300	
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct	9360	10
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	9420	
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct	9480	15
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg	9540	
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca	9600	20
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac	9660	25
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg	9720	
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag	9780	30
gtagccgat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg	9840	
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccgga cttcgcccaa tagcagccag	9900	35
tcccttcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc	9960	
agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	10020	40
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag	10080	
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa	10140	45
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga	10200	
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc	10260	50
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga	10320	55
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc	10380	
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc	10440	60
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatcccct	10500	
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac	10560	65

DE 101 02 337 A 1

cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
 5 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
 ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
 10 actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgcctgagt gcttgcgga 10800
 gcgtgaagct tgcattgctg caggctgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
 15 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
 ttigatttgc gataaatttt tatatttggc actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 20 ttigccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt cttaaattatt tttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
 25 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatgga ccacacaaga 11220
 30 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggtttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 35 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatat 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttg aggatgcaat 11400
 40 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataagagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattata atttcttcat 11520
 45 agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggctcctgc tttaatgaga 11580
 tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa 11640
 50 aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgcggttt cggttcattc taatgaatat 11700
 atcaccggtt actatcgat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
 55 gtcgagcaaa ttacacatt gccactaaac gtctaaacc ttgtaatttg tttttgtttt 11820
 60 actatgtgtg ttatgtattt gatttgcgat aaatttttat atttggact aaattataa 11880
 caccttttat gctaacgttt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta 11940
 65 aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aaatgtaaat atttgcta 12000

DE 101 02 337 A 1

atttctacta taggagaatt aaagtgagtg aatatggtac cacaaggttt ggagatttaa	12060	
ttgttgcaat gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat	12120	5
aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg ttagtaatt	12180	
tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgagggtg catgcatgga tgccctgtgg	12240	10
aaagtttaaa aatatttttg aaatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc	12300	
cacttgagg atgcaataat gaagaaaact acaaatttac atgcaactag ttatgcatgt	12360	15
agtcctatata atgaggattt tgcaataactt tcattcatatc acactcacta agttttacac	12420	
gattataatt tcttcatagc cagcggatcc gatatcgggc ccgctagcgt taaccctgct	12480	20
ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgttggtgca	12540	
cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagctc agatccttac cgccggtttc ggttcattct	12600	25
aatgaatata tcacccgtta ctatcgtatt tttatgaata atattctccg ttcaatttac	12660	30
tgattgtccg tcgagcaaat ttacacattg ccactaaacg tctaaaccct tgtaatttgt	12720	
ttttgtttta ctatgtgtgt tatgtatttg atttgcgata aatttttata tttggtacta	12780	35
aatttataac accttttatg ctaacgtttg ccaacactta gcaatttgca agttgattaa	12840	
ttgattctaa attatttttg tcttctaaat acatatacta atcaactgga aatgtaaata	12900	40
tttgctaata tttctactat aggagaatta aagtgagtga atatggtacc acaaggtttg	12960	
gagatttaat tgttgcaatg ctgcatggat ggcatataca ccaaacattc aataattctt	13020	45
gaggataata atggtaccac acaagatttg aggtgcatga acgtcacgtg gacaaaagg	13080	
ttagtaattt ttcaagacaa caatgttacc acacacaagt tttgagggtg atgcatggat	13140	50
gccctgtgga aagtttaaaa atattttgga aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac	13200	
catgacatcc acttgaggga tgcaataatg aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt	13260	55
tatgcatgta gtctatataa tgaggatttt gcaatacttt cattcatata cactcactaa	13320	60
gttttacacg attataattt cttcatagcc agcagatctg ccggcatcga tcccgggcc	13380	
tggcctgctt taatgagata tgcgagacgc ctatgatcgc atgatatttg ctttcaattc	13440	65

DE 101 02 337 A 1

1 tgttgtgcac gttgtaaaaa acctgagcat gtgtagctca gacccctacc gccgggttccg 13500
 5 gttcattcta atgaatatat caccggttac tatcgatatt ttatgaataa tattctccgt 13560
 tcaatttact gattgtccgt cgacgagctc ggcgcgcctc tagaggatcg atgaattcag 13620
 10 atcggctgag tggctccttc aacgttgccg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg 13680
 tcccgcgtca tcggcggggg tcataacgtg actcccttaa ttctccgctc atgatcagat 13740
 15 tgtcgtttcc cgcccttcagt ttaaaactatc agtggttgac aggatatatt gccgggttaa 13800
 cctaagagaa aagagcggtt attagaataa tcggatattt aaaagggcgt gaaaagggtt 13860
 20 atccttcgtc catttgatg tgcattgcaa ccacagggtt cccca 13905

 25 <210> 25
 <211> 15430
 <212> DNA
 <213> Unknown
 30
 <220>
 <223> pflanz. Expressionsvektor mit zwei Promotor-
 Terminator-Expressionskassetten inseriert ist
 35 Physcomitrella patens Elongase und Desaturase

 <220>
 40 <221> CDS
 <222> (11543) .. (12415)

 <220>
 45 <221> CDS
 <222> (13313) .. (14890)

 <400> 25
 50 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcca 120
 55 tagtgggagg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 60 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 65 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360

DE 101 02 337 A 1

tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgagggtcg	420	
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggtt gggggttcag cagccggcgc	480	5
tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg	540	
cgagaaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg	600	10
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg	660	
ccggcacgcg accgggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct	720	15
gcgaggcggg tttttcgcc ggggacgcc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca	780	
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca	840	20
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag	900	
ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggac tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa	960	25
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc	1020	
tgccggagcg caaccctc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctccccctt	1080	30
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt	1140	
ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttcctc	1200	35
gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa	1260	
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa	1320	40
agggcagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1380	
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac	1440	45
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc	1500	
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt	1560	50
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggatatat ccattctttt	1620	
tcgcacgata tacaggatth tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttctttgg tgtatccaac	1680	55
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca	1740	
ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg	1800	60
		65

DE 101 02 337 A 1

ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
 5 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
 agggggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggttaca 1980
 10 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040
 tgggcccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcacga cgacccgcgc acggcgcggt 2100
 15 tcggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
 gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
 20 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
 gacttcgagg agctgggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
 25 gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
 cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460
 30 cctcgcgga aacttgcccc tcaactgacag atgaggggag gacgttgaca cttgaggggc 2520
 cgactcacc gccgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 40 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 45 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttcgccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 50 aaaccttgtt ttttaaccag gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccgccccg ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc 3000
 55 tgcgcccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
 ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 60 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 65 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240

DE 101 02 337 A 1

cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300	
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggtg ataggtaaga ttataccgag 3360	5
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420	
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480	10
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540	
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600	15
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660	20
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720	
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780	25
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840	
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900	30
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960	
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020	35
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080	
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140	40
cgtgttgagg ccaacgcccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200	
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260	45
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccggt 4320	50
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380	
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440	55
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500	
aaaagctggt ttctgggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560	60
cttggtataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620	
taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680	65

DE 101 02 337 A 1

gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctggtggg agaaaatgaa 4740
 5 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
 10 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
 15 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
 20 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
 ccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
 25 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
 gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg ggaagaaca gtatgtcgag 5340
 30 ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400
 ctggatgaat tgTTTTtagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
 caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTtg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
 40 gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
 45 ggcaccaggc gggTcaaTc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtagg tcggggcaat 5700
 cccgcaagga gggTgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
 50 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
 gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggccag caagctacgg ccaagatcga 5880
 55 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg 5940
 ttgcgctcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
 60 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
 65

DE 101 02 337 A 1

ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc	6180	
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa	6240	5
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc	6300	
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg	6360	10
cgagccgatac accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg	6420	
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt	6480	15
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgcctg ctgcaccgct tccgcgtcct	6540	
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgata gacgaggaaa tcgtcgtgct	6600	20
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcgcac	6660	
ggcccagcgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga	6720	25
aaccttcgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt	6780	
cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggtcaatga	6840	30
tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggtca gttccggctg ggggttcagc	6900	35
agccagcgtt ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc	6960	
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa	7020	40
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc	7080	
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag	7140	45
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctt gctgaacggt tcgagatgc cgtggcattc	7200	
ggcgctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgtct tcaaacagga ggacggcccc	7260	50
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccgc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga	7320	
ggggtcgcgg gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc	7380	55
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaattatt	7440	60
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg	7500	
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgtct gctaggtagc	7560	65

DE 101 02 337 A 1

ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcgga ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
 5 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggag 7680
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccggt gcctctgtctc 7740
 10 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
 15 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
 acagtgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
 20 catcaggccg acagtcgga cttcgggtcc ccgacctga ccattcgggtg agcaatggat 8040
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
 25 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagtcc tcaagatoga cagcctgtca 8160
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
 30 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
 tcatccgtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct ccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400
 40 gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 45 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgccctggcc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 50 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttg aacaagagtc cactattaaa 8760
 55 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat caggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga 8880
 60 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaa cggcgaaacg tggcgagaaa 8940
 65 ggaagggaag aaagcgaaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000

DE 101 02 337 A 1

gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc	9060	
gattaagttg ggtaacgccg gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg	9120	5
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca	9180	
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt	9240	10
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta	9300	
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct	9360	15
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa	9420	
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct	9480	20
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg	9540	25
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca	9600	
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcgatgc gcgccttgag cctggcgaa	9660	30
agttcggtg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg	9720	
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag	9780	35
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg	9840	
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag	9900	40
tcccttccc cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgctcgtggcc	9960	
agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	10020	45
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag	10080	
ccgattgtct gttgtgccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa	10140	50
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gtccccatgg gccctcgact agagtcgaga	10200	
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc	10260	55
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga	10320	60
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc	10380	
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc	10440	65

DE 101 02 337 A 1

```

gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatgatc ttgatccct 10500
5 ggcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
10 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
15 actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcgga 10800
gcgtgaagct tgcattgctg caggctgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
20 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
tttgatttgc gataaatttt tatatttggc actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
25 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
30 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
35 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggtttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
40 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
45 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
50 agccagccca ccgcggtgga aa atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag 11572
      Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu
          1             5             10
55 ttg gat ggg aag gtc tcg cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt 11620
Leu Asp Gly Lys Val Ser Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe
          15             20             25
60 ggg gtg gag ttg acg gat acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctg gtt 11668
Gly Val Glu Leu Thr Asp Thr Pro Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val
          30             35             40
65

```

DE 101 02 337 A 1

gac agt ccc aca ccc atc gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att	11716	
Asp Ser Pro Thr Pro Ile Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile		
45 50 55		5
gtc att gga ggg ctt ttg tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc	11764	
Val Ile Gly Gly Leu Leu Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg		
60 65 70		10
gcc tcg gag cca ttt ttg ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg	11812	
Ala Ser Glu Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu		
75 80 85 90		15
ttc tgt ttt gcg ctc agt ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag	11860	
Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln		
95 100 105		20
gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa	11908	
Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys		
110 115 120		25
cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac	11956	
His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr		
125 130 135		30
gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg	12004	
Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg		
140 145 150		35
caa ata agc ttc ctc cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att	12052	
Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile		
155 160 165 170		40
tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct	12100	
Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser		
175 180 185		45
gcg gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc	12148	
Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe		
190 195 200		50
ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt	12196	
Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu		
205 210 215		55
ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg	12244	
Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu		
220 225 230		60
		65

DE 101 02 337 A 1

```

aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca 12292
Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro
5 235                240                245                250

caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt 12340
Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe
10                255                260                265

ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga 12388
Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly
15                270                275                280

aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctctgtcttt 12435
20 Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu
                285                290

aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg 12495
25

tgtataaaaa cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa 12555

tgaatatatc acccgttact atcgtatatt tatgaataat attctccgtt caatttactg 12615
30

attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttggtt 12675

ttgttttact atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tggactaaa 12735
35

tttataacac cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt 12795

gattctaaat tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaataatt 12855
40

tgctaataatt tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aaggtttgga 12915

gatttaattg ttgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga 12975
45

ggataataat ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaagggtt 13035
50

agtaattttt caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc 13095

cctgtggaaa gtttaaaaaat attttggaat tgatttgcat ggaagccatg tgtaaaacca 13155
55

tgacatccac ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta 13215

tgcatgtagt ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctactaagt 13275
60

tttacacgat tataatttct tcatagccag cggatcc atg gta ttc gcg ggc ggt 13330
Met Val Phe Ala Gly Gly
65                295

```

DE 101 02 337 A 1

gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att	13378	
Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile		
300 305 310		5
gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act	13426	
Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr		
315 320 325		10
gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg	13474	
Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr		
330 335 340 345		15
agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct	13522	
Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala		
350 355 360		20
gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca	13570	
Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala		
365 370 375		25
gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag	13618	
Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys		
380 385 390		30
tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat	13666	
Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp		
395 400 405		35
tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg	13714	
Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala		
410 415 420 425		40
gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac	13762	
Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp		
430 435 440		45
ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att	13810	
Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile		
445 450 455		50
ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca	13858	
Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro		
460 465 470		55
gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag	13906	
Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu		
475 480 485		60
		65

DE 101 02 337 A 1

	caa	ctt	ttc	aaa	agt	tcg	aaa	ttg	tac	tat	gtt	atg	aag	ctg	ctc	acg	13954
	Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Val	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	
5	490					495					500					505	
	aat	gtt	gct	att	ttt	gct	gcg	agc	att	gca	ata	ata	tgt	tgg	agc	aag	14002
10	Asn	Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ile	Ile	Cys	Trp	Ser	Lys	
					510					515					520		
	act	att	tca	gcg	gtt	ttg	gct	tca	gct	tgt	atg	atg	gct	ctg	tgt	ttc	14050
15	Thr	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Cys	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Phe	
				525					530					535			
	caa	cag	tgc	gga	tgg	cta	tcc	cat	gat	ttt	ctc	cac	aat	cag	gtg	ttt	14098
20	Gln	Gln	Cys	Gly	Trp	Leu	Ser	His	Asp	Phe	Leu	His	Asn	Gln	Val	Phe	
			540					545					550				
	gag	aca	cgc	tgg	ctt	aat	gaa	gtt	gtc	ggg	tat	gtg	atc	ggc	aac	gcc	14146
25	Glu	Thr	Arg	Trp	Leu	Asn	Glu	Val	Val	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Asn	Ala	
		555					560					565					
	gtt	ctg	ggg	ttt	agt	aca	ggg	tgg	tgg	aag	gag	aag	cat	aac	ctt	cat	14194
30	Val	Leu	Gly	Phe	Ser	Thr	Gly	Trp	Trp	Lys	Glu	Lys	His	Asn	Leu	His	
	570					575					580					585	
	cat	gct	gct	cca	aat	gaa	tgc	gat	cag	act	tac	caa	cca	att	gat	gaa	14242
35	His	Ala	Ala	Pro	Asn	Glu	Cys	Asp	Gln	Thr	Tyr	Gln	Pro	Ile	Asp	Glu	
					590						595				600		
	gat	att	gat	act	ctc	ccc	ctc	att	gcc	tgg	agc	aag	gac	ata	ctg	gcc	14290
40	Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Pro	Leu	Ile	Ala	Trp	Ser	Lys	Asp	Ile	Leu	Ala	
				605					610					615			
	aca	gtt	gag	aat	aag	aca	ttc	ttg	cga	atc	ctc	caa	tac	cag	cat	ctg	14338
45	Thr	Val	Glu	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gln	His	Leu	
			620					625					630				
	ttc	ttc	atg	ggt	ctg	tta	ttt	ttc	gcc	cgt	ggt	agt	tgg	ctc	ttt	tgg	14386
50	Phe	Phe	Met	Gly	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Arg	Gly	Ser	Trp	Leu	Phe	Trp	
		635					640					645					
	agc	tgg	aga	tat	acc	tct	aca	gca	gtg	ctc	tca	cct	gtc	gac	agg	ttg	14434
55	Ser	Trp	Arg	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Val	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Arg	Leu	
	650					655					660					665	
60																	
	ttg	gag	aag	gga	act	gtt	ctg	ttt	cac	tac	ttt	tgg	ttc	gtc	ggg	aca	14482
65	Leu	Glu	Lys	Gly	Thr	Val	Leu	Phe	His	Tyr	Phe	Trp	Phe	Val	Gly	Thr	
				670					675					680			

DE 101 02 337 A 1

gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg	14530	
Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val		
685 690 695		5
act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc	14578	
Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser		
700 705 710		10
cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca	14626	
His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala		
715 720 725		15
cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg	14674	
Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp		
730 735 740 745		20
ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca	14722	
Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr		
750 755 760		25
atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc	14770	
Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe		
765 770 775		30
tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc	14818	
Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly		
780 785 790		35
act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca	14866	
Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala		
795 800 805		40
gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgtta accctgcttt aatgagatat	14920	
Glu Gln His Ala Thr Thr Ser		
810 815		45
gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa	14980	
		50
cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatatatc	15040	
		55
accggttact atcgtatttt tatgaataat attctccgtt caatttactg attgtccgtc	15100	
		60
gacgaattcg agctcggcgc gcctctagag gatcgaatgaa ttcagatcgg ctgagtggct	15160	
		65
ccttcaacgt tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg cgtcatcggc	15220	
gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg tttcccgctt	15280	

DE 101 02 337 A 1

tcagttttaa ctatcagtgt ttgacaggat atattggcgg gtaaacctaa gagaaaagag 15340

5 cgtttattag aataatcgga tattttaaaag ggcgtgaaaa gggtttatcct tcgtccattt 15400

gtatgtgcat gcccaaccaca gggttcccca 15430

10 <210> 26
 <211> 290
 <212> PRT
 15 <213> Unknown

<400> 26

20 Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 25 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 30 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

35 Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

40 Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 45 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 50 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140

55 Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160

60 Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175

65 His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly

DE 101 02 337 A 1

180	185	190	
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg			5
195	200	205	
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu			10
210	215	220	
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr			15
225	230	235	240
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile			20
	245	250	255
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr			25
	260	265	270
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys			30
	275	280	285
Thr Glu			35
290			
<210> 27			40
<211> 525			
<212> PRT			
<213> Unknown			45
<400> 27			
Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn			50
1	5	10	15
Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe			55
	20	25	30
Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln			60
	35	40	45
Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala			65
	50	55	60
Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly			70
65	70	75	80
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg			75
	85	90	95

DE 101 02 337 A 1

	Ser	Ser	Gln	Trp	Lys	Lys	Ser	Thr	His	Pro	Leu	Ser	Glu	Val	Ala	Val	
				100					105					110			
5	His	Asn	Lys	Pro	Ser	Asp	Cys	Trp	Ile	Val	Val	Lys	Asn	Lys	Val	Tyr	
			115					120					125				
10	Asp	Val	Ser	Asn	Phe	Ala	Asp	Glu	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	
		130						135				140					
15	Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Phe	Ser	Ser	Phe	His	Ala	
	145					150					155					160	
20	Ala	Ser	Thr	Trp	Lys	Ile	Leu	Gln	Asp	Phe	Tyr	Ile	Gly	Asp	Val	Glu	
					165					170					175		
25	Arg	Val	Glu	Pro	Thr	Pro	Glu	Leu	Leu	Lys	Asp	Phe	Arg	Glu	Met	Arg	
				180						185				190			
30	Ala	Leu	Phe	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Leu	Tyr	Tyr	
			195					200					205				
35	Val	Met	Lys	Leu	Leu	Thr	Asn	Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	
		210					215					220					
40	Ile	Ile	Cys	Trp	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Cys	
	225					230				235					240		
45	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Phe	Gln	Gln	Cys	Gly	Trp	Leu	Ser	His	Asp	Phe	
				245						250					255		
50	Leu	His	Asn	Gln	Val	Phe	Glu	Thr	Arg	Trp	Leu	Asn	Glu	Val	Val	Gly	
				260					265					270			
55	Tyr	Val	Ile	Gly	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Phe	Ser	Thr	Gly	Trp	Trp	Lys	
		275						280					285				
60	Glu	Lys	His	Asn	Leu	His	His	Ala	Ala	Pro	Asn	Glu	Cys	Asp	Gln	Thr	
		290					295					300					
65	Tyr	Gln	Pro	Ile	Asp	Glu	Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Pro	Leu	Ile	Ala	Trp	
	305					310				315					320		
70	Ser	Lys	Asp	Ile	Leu	Ala	Thr	Val	Glu	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	
				325						330				335			
75	Leu	Gln	Tyr	Gln	His	Leu	Phe	Phe	Met	Gly	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Arg	
			340						345					350			

DE 101 02 337 A 1

Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu	
355 360 365	
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr	5
370 375 380	
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro	10
385 390 395 400	
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly	15
405 410 415	
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser	20
420 425 430	
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly	25
435 440 445	
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu	30
450 455 460	
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala	35
465 470 475 480	
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp	40
485 490 495	
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu	45
500 505 510	
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser	50
515 520 525	
<210> 28	
<211> 17752	
<212> DNA	55
<213> Unknown	
<220>	60
<223> pflanz. Expressionsvektor mit 3	
Promotor-Terminator- Expressionskassetten	
inseriert mit Physcomitrella Elongase + Desaturase	
+ Phaeodactylum Desaturase	65
<220>	
<221> CDS	
<222> (11543) .. (12415)	

DE 101 02 337 A 1

```

<220>
<221> CDS
<222> (13313) .. (14890)
5

<220>
<221> CDS
10 <222> (15791) .. (17200)

<400> 28
gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
15 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgccca 120
tagtgggccc tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180
20 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttggggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
25 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
30 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacggtt ggggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
35 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcatccatg 660
40 ccggcacgcg accgggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
cgagggcggg tttttcgcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
45 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcgcca 840
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
60 ccaccgcgtc agacgcccgt agcagcccgc tacgggcttt ttcatgccct gccctagcgt 1140
65

```

DE 101 02 337 A 1

ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttcctc	1200	
gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa	1260	5
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa	1320	
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct	1380	10
ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac	1440	
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaaagctcc ctctgcgct ctctgttcc	1500	15
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt	1560	
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccatcctttt	1620	20
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac	1680	
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca	1740	25
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg	1800	30
ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga	1860	
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa	1920	35
aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca	1980	
aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc	2040	40
tgggcccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgacccgcgc acggcgcggt	2100	
tcggtgatgc cagcatctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg	2160	45
gcaaggtcac gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa	2220	
aacggccggg ggggtgcgct gattgccaaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc	2280	50
gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc	2340	
gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa	2400	55
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcgggc gttgtggata	2460	60
cctcgcggaa aacttgccc tctactgacag atgaggggag gacgttgaca cttgaggggc	2520	
cgactcacc gccgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg	2580	65

DE 101 02 337 A 1

gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
 5 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
 tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
 10 gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
 ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
 15 aaaccttgtt tttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
 tgccccccct tctcgaacct tcccggcccc ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
 20 tgccccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
 ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
 25 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
 gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
 30 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
 35 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
 40 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
 45 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaaact 3600
 tgcatggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
 50 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatgtt cagataatgc ccgatgactt 3720
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
 55 gctgcctcag attcaggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
 60 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
 65 atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020

DE 101 02 337 A 1

gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgagacg atgacgtcac	4080	
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat	4140	5
cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgcccg catccaacgc cattcatggc	4200	
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg	4260	10
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcggtgc ttttgccgtt	4320	
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg	4380	15
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg	4440	
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga	4500	20
aaaagctgtt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagtctgt	4560	
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa	4620	25
taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc	4680	
gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtgg agaaaatgaa	4740	30
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg	4800	
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt	4860	35
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg	4920	40
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac	4980	
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc	5040	45
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg	5100	
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag	5160	50
cccgaagagg aacttgctctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa	5220	
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat	5280	55
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag	5340	60
ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta	5400	
ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg	5460	65

DE 101 02 337 A 1

caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520

5 gggcaagggg tcgctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580

cgccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640

10 ggcaccaggc gggtaaatac aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700

cccgcaagga gggatgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760

15 cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820

gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880

20 gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg 5940

ttcgcgtcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000

25 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060

cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120

30 ttccttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc 6180

ccgtctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccc cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240

35 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300

cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360

cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420

45 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480

cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtcg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540

50 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600

gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660

55 ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtacccgc tcaagctgga 6720

aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780

60 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga 6840

65 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900

DE 101 02 337 A 1

agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc	6960	
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa	7020	5
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc	7080	
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag	7140	10
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc	7200	
ggcgccatac tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc	7260	15
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga	7320	
ggggtcgccc gtatgctgct gcgggcgctg ccggcggggt tattgtcgt gatgatcgtc	7380	20
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatat	7440	
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcgcggcg	7500	25
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcattc ctgccgctc gctaggtagc	7560	
ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcgggctt ggcgctgttg	7620	30
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg	7680	
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc	7740	35
acctttaccg cctggcaact ggcgcccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg	7800	
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc	7860	40
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct	7920	
acagttgttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg	7980	45
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggg agcaatggat	8040	
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag	8100	50
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca	8160	
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata	8220	55
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga	8280	
tcatccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcgtaacat	8340	60
		65

DE 101 02 337 A 1

gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400
 5 gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
 10 gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
 tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
 15 gcaggcgaaa atcctgtttg atgggtggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
 agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
 20 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
 25 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
 ggaaggggaag aaagcgaaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
 30 gatcgggtcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc 9060
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
 35 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaattttt attgataaaa taacaagtca 9180
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
 45 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
 50 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccatttcgcc gccaaagctct 9480
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
 55 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttcacca tgatattcgg caagcaggca 9600
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660
 60 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
 65 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780

DE 101 02 337 A 1

gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg	9840	
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag	9900	5
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc	9960	
agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc	10020	10
ttgacaaaaa gaaccggggc cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag	10080	
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccacccaagc ggccggagaa	10140	15
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga	10200	
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc	10260	20
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgacctagg cgacttttga	10320	25
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc	10380	
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaacgg cttgtccgc	10440	30
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatgatc ttgatccct	10500	
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttccaac	10560	35
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca	10620	
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt	10680	40
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccg ggtcagcacc gtttctgcgg	10740	
actggctttc tacgtgttcc gtttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcgga	10800	45
gcgtgaagct tgcatgcctg caggtcgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac	10860	
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgttttgt tttactatgt gtgttatgta	10920	50
tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacacctt tatgctaacg	10980	55
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct	11040	
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga	11100	60
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat	11160	
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatgga ccacacaaga	11220	65

DE 101 02 337 A 1

	tttgagggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt	11280
5	taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt	11340
	tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat	11400
10	aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca ttagtctat ataatgagga	11460
	ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat	11520
15	agccagccca ccgcggtgga aa atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag	11572
	Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu	
	1 5 10	
20	ttg gat ggg aag gtc tcg cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt	11620
	Leu Asp Gly Lys Val Ser Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe	
	15 20 25	
25	ggg gtg gag ttg acg gat acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt	11668
	Gly Val Glu Leu Thr Asp Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val	
	30 35 40	
30	gac agt ccc aca ccc atc gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att	11716
	Asp Ser Pro Thr Pro Ile Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile	
35	45 50 55	
	gtc att gga ggg ctt ttg tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc	11764
	Val Ile Gly Gly Leu Leu Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg	
40	60 65 70	
	gcc tcg gag cca ttt ttg ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg	11812
	Ala Ser Glu Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu	
45	75 80 85 90	
	ttc tgt ttt gcg ctc agt ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag	11860
50	Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln	
	95 100 105	
	gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa	11908
55	Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys	
	110 115 120	
60	cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac	11956
	His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr	
	125 130 135	
65	gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg	12004
	Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg	

DE 101 02 337 A 1

140	145	150		
caa ata agc ttc ctc cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att	12052			5
Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile				
155 160 165 170				
tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct	12100			10
Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser				
175 180 185				
gcg gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc	12148			15
Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe				
190 195 200				
ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt	12196			20
Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu				
205 210 215				
ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg	12244			25
Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu				
220 225 230				30
aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca	12292			
Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro				
235 240 245 250				35
caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt	12340			
Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe				
255 260 265				40
ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga	12388			
Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly				
270 275 280				45
aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctctgcttt	12435			
Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu				50
285 290				
aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg	12495			
ttgtaaaaaa cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa	12555			55
tgaatatatc acccgttact atcgtatattt tatgaataat attctccggt caatttactg	12615			60
attgtccgtc gagcaaatat acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt	12675			
ttgttttact atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tgggtactaaa	12735			65

DE 101 02 337 A 1

tttataacac cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt 12795
 5 gatttctaaat tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaatatt 12855
 tgctaataatt tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aaggtttgga 12915
 10 gattttaattg ttgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga 12975
 ggataataat ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaagggtt 13035
 15 agtaattttt caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgagggtgcat gcatggatgc 13095
 cctgtggaaa gtttaaaaaat attttggaaa tgatttgcat ggaagccatg tgtaaaacca 13155
 20 tgacatccac ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta 13215
 tgcatgtagt ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctactaagt 13275
 25 tttacacgat tataatttct tcatagccag cggatcc atg gta ttc gcg ggc ggt 13330
 Met Val Phe Ala Gly Gly
 295
 30
 gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att 13378
 Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile
 35 300 305 310
 gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act 13426
 Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr
 40 315 320 325
 gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg 13474
 Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr
 45 330 335 340 345
 agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct 13522
 50 Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala
 350 355 360
 gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca 13570
 55 Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala
 365 370 375
 gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag 13618
 60 Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys
 380 385 390
 65 tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat 13666
 Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp

DE 101 02 337 A 1

395	400	405		
tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg			13714	5
Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala				
410	415	420	425	
gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac			13762	10
Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp				
	430	435	440	
ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att			13810	15
Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile				
	445	450	455	
ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca			13858	20
Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro				
	460	465	470	
gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag			13906	25
Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu				
	475	480	485	
caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat gtt atg aag ctg ctc acg			13954	30
Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr Val Met Lys Leu Leu Thr				
490	495	500	505	
aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca ata ata tgt tgg agc aag			14002	35
Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala Ile Ile Cys Trp Ser Lys				
	510	515	520	
act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt atg atg gct ctg tgt ttc			14050	40
Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys Met Met Ala Leu Cys Phe				
	525	530	535	
caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt ctc cac aat cag gtg ttt			14098	45
Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Phe				
	540	545	550	
gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg tat gtg atc ggc aac gcc			14146	50
Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Gly Asn Ala				
	555	560	565	
gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag gag aag cat aac ctt cat			14194	55
Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys Glu Lys His Asn Leu His				
570	575	580	585	
cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act tac caa cca att gat gaa			14242	60
His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Ile Asp Glu				
				65

DE 101 02 337 A 1

	590	595	600	
5	gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg agc aag gac ata ctg gcc Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp Ser Lys Asp Ile Leu Ala 605 610 615	14290		
10	aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc ctc caa tac cag cat ctg Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile Leu Gln Tyr Gln His Leu 620 625 630	14338		
15	ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt ggt agt tgg ctc ttt tgg Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg Gly Ser Trp Leu Phe Trp 635 640 645	14386		
20	agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc tca cct gtc gac agg ttg Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu Ser Pro Val Asp Arg Leu 650 655 660 665	14434		
25	ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr 670 675 680	14482		
30	gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val 685 690 695	14530		
35	act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser 700 705 710	14578		
40	cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala 715 720 725	14626		
45	cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp 730 735 740 745	14674		
50	ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr 750 755 760	14722		
55	atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe 765 770 775	14770		
60	tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly	14818		

DE 101 02 337 A 1

780	785	790		
act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca			14866	
Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala				5
795	800	805		
gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgta accctgcttt aatgagatat			14920	
Glu Gln His Ala Thr Thr Ser				10
810	815			
gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa			14980	
cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatatatc			15040	
accogttact atcgtatttt tatgaataat attctccggt caatttactg attgtccgtc			15100	20
gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt ttgttttact			15160	
atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tgggtactaaa tttataacac			15220	25
cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt gattctaaat			15280	
tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaataatt tgctaataatt			15340	30
tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aaggtttgga gatttaattg			15400	
ttgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga ggataataat			15460	35
ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaagggtt agtaattttt			15520	
caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgagggtgcat gcatggatgc cctgtggaaa			15580	40
gtttaaaaat attttgaaa tgatttgcat ggaagccatg tgtaaaacca tgacatccac			15640	
ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta tgcatgtagt			15700	45
ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctcactaagt ttacacgat			15760	
tataatttct tcatagccag cagatctaaa atg gct ccg gat gcg gat aag ctt			15814	50
Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu				55
	820	825		
cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg aag cac aat gct gct acc ata			15862	
Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile				60
	830	835	840	
tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa			15910	
Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu				65

DE 101 02 337 A 1

	845	850	855	
5	gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac ctc caa tca ttc gat cat ccc Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro 860 865 870	15958		
10	ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt ggc aac gat gtc act gta cag Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln 875 880 885	16006		
15	tac aag atg att cac ccg tac cat acc gag aag cat ttg gaa aag atg Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met 890 895 900 905	16054		
20	aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc gtc tgc gag tac aag ttc gat Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp 910 915 920	16102		
25	acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga gaa gtc ttc aag att gtg cga Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg 925 930 935	16150		
30	cga ggc aag gat ttc ggt act ttg gga tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys 940 945 950	16198		
35	tac att gcc att ttc ttc tac ctg cag tac cat tgg gtc acc acg gga Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly 955 960 965	16246		
40	acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc tac gga atc tcc caa gcg atg att Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile 970 975 980 985	16294		
45	ggc atg aat gtc cag cac gat gcc aac cac ggg gcc acc tcc aag cgt Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg 990 995 1000	16342		
50	ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc ctc ggt gcg gat ttt att ggt ggt Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly 1005 1010 1015	16390		
55	tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa cac tgg acc cac cac gct tac acc Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln His Trp Thr His His Ala Tyr Thr 1020 1025 1030	16438		
60	aat cac gcc gag atg gat ccc gat agc ttt ggt gcc gaa cca atg ctc Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu	16486		

DE 101 02 337 A 1

1035	1040	1045		
cta ttc aac gac tat ccc ttg gat cat ccc gct cgt acc tgg cta cat			16534	5
Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His				
1050	1055	1060	1065	
cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg ccc gtc ttg gct gga tac tgg ttg			16582	10
Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu				
1070	1075	1080		
tcc gct gtc ttc aat cca caa att ctt gac ctc cag caa cgc ggc gca			16630	15
Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala				
1085	1090	1095		
ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac aac gct ttc att cac tcg cga cgc			16678	20
Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg				
1100	1105	1110		
aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct gtg tac att gcg gtg aac gtg att			16726	25
Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile				
1115	1120	1125		30
gct ccg ttt tac aca aac tcc ggc ctc gaa tgg tcc tgg cgt gtc ttt			16774	
Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe				
1130	1135	1140	1145	35
gga aac atc atg ctc atg ggt gtg gcg gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc			16822	
Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val				
1150	1155	1160		40
ctg ttt tcg ttg tcg cac aat ttc gaa tcc gcg gat cgc gat ccg acc			16870	
Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr				
1165	1170	1175		45
gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa cca gtc gac tgg ttc aag aca cag			16918	
Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln				
1180	1185	1190		50
gtc gaa act tcc tgc act tac ggt gga ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg			16966	
Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr				
1195	1200	1205		55
gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa cac cac ttg ttc cca cgc atg agc			17014	
Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser				
1210	1215	1220	1225	60
agc gct tgg tat ccc tac att gcc ccc aag gtc cgc gaa att tgc gcc			17062	
Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala				65

DE 101 02 337 A 1

	1230	1235	1240	
5	aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac tac ccg tgg atc cac caa aac ttt			17110
	Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe			
	1245	1250	1255	
10	ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac gcg gcc ggg acc ggt gcc aac tgg			17158
	Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp			
	1260	1265	1270	
15	cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc ttg acc gga cgg gcg taa			17200
	Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro Leu Thr Gly Arg Ala			
	1275	1280	1285	
20	agatctgccg gcatcgatcc cgggccatgg cctgctttaa tgagatatgc gagacgccta			17260
	tgatcgcatg atatttgctt tcaattctgt tgtgcacggt gtaaaaaacc tgagcatgtg			17320
25	tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggt cattctaata aatatacac ccgttactat			17380
	cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtcga cgagctcggc			17440
30	gcgcctctag aggatcgatg aattcagatc ggctgagtgg ctccttcaac gttgcgggtc			17500
	tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttgtcc cgcgtcatcg gcgggggtca taacgtgact			17560
35	cccttaattc tccgctcatg atcagattgt cgtttcccg cttcagttta aactatcagt			17620
	gtttgacagg atatattggc gggtaaacct aagagaaaag agcgtttatt agaataatcg			17680
40	gatatttaaa agggcgtgaa aagggttatc ctctgtccat ttgtatgtgc atgccaacca			17740
45	cagggttccc ca			17752
50	<210> 29			
	<211> 290			
	<212> PRT			
	<213> Unknown			
55	<400> 29			
	Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser			
	1 5 10 15			
60	Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp			
	20 25 30			
65	Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile			

DE 101 02 337 A 1

35	40	45	
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu			5
50	55	60	
Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu			10
65	70	75	80
Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser			15
	85	90	95
Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr			
	100	105	110
Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile			20
	115	120	125
Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr			25
	130	135	140
Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His			30
145	150	155	160
Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His			35
	165	170	175
His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly			40
	180	185	190
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg			
	195	200	205
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu			45
	210	215	220
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr			50
225	230	235	240
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile			55
	245	250	255
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr			60
	260	265	270
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys			
	275	280	285
Thr Glu			65

DE 101 02 337 A 1

290

5 <210> 30
 <211> 525
 <212> PRT
 10 <213> Unknown

 <400> 30
 Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 15 1 5 10 15

 Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
 20 20 25 30

 Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
 35 40 45
 25 Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
 50 55 60
 30 Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
 65 70 75 80
 35 Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
 85 90 95

 Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
 40 100 105 110

 His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
 115 120 125
 45 Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
 130 135 140
 50 Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
 145 150 155 160
 55 Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
 165 170 175

 Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
 60 180 185 190

 Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
 195 200 205
 65

DE 101 02 337 A 1

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala	
210 215 220	
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys	5
225 230 235 240	
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe	10
245 250 255	
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly	15
260 265 270	
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys	20
275 280 285	
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr	25
290 295 300	
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp	30
305 310 315 320	
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile	35
325 330 335	
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg	40
340 345 350	
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu	45
355 360 365	
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr	50
370 375 380	
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro	55
385 390 395 400	
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly	60
405 410 415	
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser	65
420 425 430	
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly	
435 440 445	
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu	
450 455 460	

DE 101 02 337 A 1

	His	His	Leu	Phe	Pro	Thr	Met	Pro	Arg	His	Asn	Leu	Asn	Lys	Ile	Ala	465	470	475	480
5	Pro	Arg	Val	Glu	Val	Phe	Cys	Lys	Lys	His	Gly	Leu	Val	Tyr	Glu	Asp		485	490	495
10	Val	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Thr	Cys	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	500	505	510	
15	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	His	Ala	Thr	Thr	Ser				515	520	525	
20	<210> 31																			
	<211> 469																			
	<212> PRT																			
	<213> Unknown																			
25	<400> 31																			
	Met	Ala	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln	Thr	Thr	Ala	Val				
30	1				5					10					15					
	Ala	Lys	His	Asn	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Thr	Gln	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	20	25	30	
35	Leu	Ser	Ser	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	Ile	Ile	Tyr	35	40	45	
40	Asp	Leu	Gln	Ser	Phe	Asp	His	Pro	Gly	Gly	Glu	Thr	Ile	Lys	Met	Phe	50	55	60	
45	Gly	Gly	Asn	Asp	Val	Thr	Val	Gln	Tyr	Lys	Met	Ile	His	Pro	Tyr	His	65	70	75	80
	Thr	Glu	Lys	His	Leu	Glu	Lys	Met	Lys	Arg	Val	Gly	Lys	Val	Thr	Asp		85	90	95
50																				
	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asp	Thr	Glu	Phe	Glu	Arg	Glu	Ile	Lys	100	105	110	
55	Arg	Glu	Val	Phe	Lys	Ile	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Leu	115	120	125	
60	Gly	Trp	Phe	Phe	Arg	Ala	Phe	Cys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Phe	Phe	Tyr	Leu	130	135	140	
65	Gln	Tyr	His	Trp	Val	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	145	150	155	160

DE 101 02 337 A 1

Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala	
165 170 175	
Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly	5
180 185 190	
Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln	10
195 200 205	
His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp	15
210 215 220	
Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp	20
225 230 235 240	
His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met	25
245 250 255	
Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile	30
260 265 270	
Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp	35
275 280 285	
Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala	40
290 295 300	
Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly	45
305 310 315 320	
Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val	50
325 330 335	
Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe	55
340 345 350	
Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu	60
355 360 365	
Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly	65
370 375 380	
Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu	
385 390 395 400	
His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala	
405 410 415	

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
 420 425 430

5 Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
 435 440 445

10 Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
 450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala
 15 465

Patentansprüche

- 20 1. Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern mit einem erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe
- 25 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
 b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist,
- 30 in einen Fettsäureester produzierenden Organismus einbringt, anzieht und die in dem Organismus enthaltenen Fettsäureester isoliert.
- 35 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die durch das Verfahren hergestellten Fettsäureester mehrfach ungesättigte C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester enthalten.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids isoliert werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein Tier oder eine Pflanze ist.
- 40 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, wobei die Fettsäureester C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäureester enthalten.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die in den Fettsäureestern enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren freisetzt.
- 45 8. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
 b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
- 50 9. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8.
10. Aminosäuresequenz nach Anspruch 9, codiert durch die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte Sequenz.
11. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist,
- 60 12. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 11, wobei im Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sind.
13. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 11 oder 12, wobei als Biosynthesegen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels im Nukleinsäurekonstrukt ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylasen, Lipoxigenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) enthalten ist.
- 65

14. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11.
15. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8, mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 14.
16. Organismus nach Anspruch 15, wobei es sich bei dem Organismus um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt. 5
17. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8, ein funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 oder einen funktionellen oder nicht funktionellen Vektor gemäß Anspruch 14.
18. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8 oder eines Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 zur Herstellung von transgenen Pflanzen. 10
19. Antikörper, der spezifisch ein Polypeptid, das von einer der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 8 codiert wird, bindet.
20. Antisense-Nukleinsäuremolekül, das die Komplementärsequenz der Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 umfasst.
21. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7. 15
22. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon gemäß Anspruch 21 enthalten.
23. Verwendung der Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon gemäß Anspruch 21 oder der Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 22 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. 20
24. Verfahren zur Identifikation eines Antagonisten oder Agonisten von Desaturasen, umfassend
 - a) in Kontaktbringen der Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Kandidatenstoff;
 - b) Testen der Desaturase-Aktivität;
 - c) Vergleichen der Desaturase-Aktivität mit einer Standardaktivität in Abwesenheit des Kandidatenstoffs, wobei ein Anstieg der Desaturase-Aktivität über den Standard anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Agonist und eine Verringerung der Desaturase-Aktivität anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Antagonist ist. 25
25. Kit, umfassend die Nukleinsäure gemäß Anspruch 8, das Nukleinsäurekonstrukt nach den Ansprüchen 11 bis 13, den Antikörper gemäß Anspruch 19, das Antisense-Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 20, einen Antagonisten oder Agonisten identifiziert gemäß Anspruch 24, die Zusammensetzung nach Anspruch 27, die Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 9. 30
26. Kit nach Anspruch 25 enthaltend Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon gemäß Anspruch 21 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 22.
27. Zusammensetzung, enthaltend den Antikörper gemäß Anspruch 19, das Antisense-Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 20 oder einen Antagonisten oder Agonisten identifiziert gemäß Anspruch 24. 35

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

Figur 1: Polypeptidvergleich der Codierregionen von Pp_des 6 (obere Reihe) mit der EST-Sequenz von PT001078032R (untere Reihe)

```

398 WKPLVWMAVTELMMSGMLLGFVFLSHNGMEVYNSSKEFVSAQI-----VSTR 444
      W+      + + +      + L +F LSHN      + S+      +A +      V T
430 WRVFGNIMLMGVAESLALAVLFSLSHN----FESADRDPTAPLKKTGEPVDWFKTQVETS 263
445 DIKGNIFNDWFTGGLNRQIEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVY 494
      G      + FTGGLN Q+EHHLFP M      IAP+V      C KHG+ Y
262 CTYGGFLSGCFTGGLNFQVEHHLFPRMSSAWYXYIAPKVREICAKHGVHY 113

```

Figur 2: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Ma_des12 (obere Sequenz) mit PT001070010R

```

105 GVWVLAHECGHQSFSSTSKTLNN 126
      G WVLAHECGH +FS +++L +
533 GFWVLAHECGHGAFSKNRSLQD 598

```

Figur 2a: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Ma_des12 (obere Sequenz) mit PT001072031R

```

117 SFSTSKTLNNTVGVILHSMLLVPYHSWRISHSKHH 151
      ++S S+T N+ VG+I+H LLVPY +W+ +H+KHH
465 AYSDSQTFNDVVGFIVHQALLVPYFAWQYTHAKHH 569

```

Figur 3: Polypeptidvergleich von Codierregionen eines PCR Produktes aus Primerpaar F6a und R4a2 codierend für ein Desaturase Fragment (obere Reihe) aus *Phaodactylum* mit der Sequenz T36617 aus *Streptomyces coelicolor* (untere Reihe)

```

1  WWKNKHNGHHAVPNLHCSSAVAQDGDPDIDTMPLLAWSVQQAQSYRELQADGKDSGLVKF 60
      WW++KH  HHA PN      +D DPDI  LL WS  QA++      +GL +
114 WWQDKHTRHHANPN-----TEDLDPDIGP-DLLVWSPDQARAA-----TGLPRL 156
61  MIRNQSYFYFPILLARLSWLNESFKCAFGLGAASENAALELKAKGLQYPLLEKAGILLH 120
      + R Q++ +FP+L L      E F      G A  N  L+ +A      L+ A +L H
157 LGRWQAFLEFFPLLT-----EGFNLHVASGRAMANRRLKRR-----LDGALLLAH 202
121 YAWMLTVSSGFRXXXXXXXXXXXXXXXXXXCGFLLAIVFGLGHNGMATYNADARPDFWKLQ 180
      A LT      F      G L      F  H GM      AD RPDF + Q
203 CAVYLTAL--FWVLPPGMAIAFLAVHQCLFGVYLGSAFAPNHKGMPILTADDRPDFLRRQ 260
181 VTTTRNVTGGHGFQAFVDWFCGGLQYQVDHHLFPS 216
      V T+RNV GG      F D      GGL +Q++HHLFPS
261 VLTSRNVNGG-----LFTDLALGGLNHQIEHHLFPS 291

```

Figur 4: Polypeptidvergleich von Codierregionen aus Pp_des6
(obere Reihe) verglichen mit Pt_des6 (untere Reihe)

```

51 KRLTSKKRVSESAAVQCISAEVQRNSSTQGTAEALAESVVKPTRRRSSQW 100
      . | . | .
1 .....MGKGGDARASKG 12
      .
101 KKSTHPLS..EVAVHNKPSDCWIVVKNKVYDVSNFADEHPGGSVISTYFG 148
      . :| || | | ||: |||||. |||||. | :|
13 STAARKISWQEVKTHASPEDAWIIHSNKVYDVSNW.HEHPGGAVIFTHAG 61
      .
149 RDGTDVFSSFHAASWTKILQDFYIGDV..ERVEPTPELL...KDFREMRA 193
      | ||:|..||| . ::. ||||:| . | : : | :||:|.
62 DDMTDIFAFAFHAPGSQSLMKKFYIGELLPETTGKEPQQIAFEKGYRDLRS 111
      .
194 LFLREQLFKSSKLYYVMKLLTNVAIFAASIAIICWSKTISAVLASACMMA 243
      : :|||. | :| | |. |. |||. ||. |:: :| |||| |:
112 KLIMMGFMKSNKWFYVYKCLSNMAIWAACALVFYSDRFWVHLASAVMLG 161
      .
244 LCFQQCGWLSHDFLHNQVFETRWNNEVVGYYVIGNAVLGFSTGWWKEKHNL 293
      ||| |||. |||||. ||| | :. | || . |:| ||| |||
162 TFFQQSGWLAHDFLHHQVFTKRKHGDLGGLFWGNLMQGYSVQWWKNKHNG 211
      .
294 HHAAPN.ECDQTY.QPIDEDIDTLPLIAWS.....KDILATVENKTFL 334
      ||| || | | | ||||:|:| ||| ::: | .. .
212 HHAVPNLHCSSAVAQDGDPDIDTMPLLAWSVQQAQSYRELQADGKDSGLV 261
      .
335 R.ILQYQHLFFMGLLFFARGSWLFWWR.....YTSTAVLSPVDR... 373
      : :. | | : :| || ||| |.: . | | :
262 KFMIRNQSYFYFPILLARLSWLNESFKCAFGGLGAASENAALELKAKGLQ 311
      .
374 ..LLEKGTVLPHYFWFVGTTAC.YLLPGWKPLVWMAVTELMG.GMLLGFVF 419
      |||| :| || | . . : . . . | || || ||
312 YPILLEKAGILLHYAWMLTVSSGGRFSFAYTAFYFLTATASCGFLLAIVF 361
      .
420 VLSHNGMEVYNSS..KEFVSAQIVSTRDIKG....NIFNDWFTGGLNRQ 462
      | |||| ||. :| | :. ||.: | | || ||| |
362 GLGHNGMATYNADARPDFWKLQVTTTRNVTGGHGFPAFVDWFCGGLQYQ 411
      .
463 IEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVYEDVSIATGTCKVLKALKE 512
      ::||||||. :||| || || |||. |. | : : || .|| |
412 VDHHLFPSLPRHNLAETHALVESFCKEWGVQYHEADLVDGTMEVLHHLGS 461
      .
513 VAEAAAEQHATTS.... 525
      || |
462 VAGEFVVDFVRDGPAM. 477

```

Figur 5: Polypeptidvergleich von Codierregionen aus Pp_des6
(obere Reihe) verglichen mit Pt_des5 (untere Reihe)

```

51 KRLTSKKRVSESAAVQCISAEVQRNSSTQGTAEALAESVVKPTRRRSSQW 100
      :| | .|...
1 .....MAPDADKLRQRQTAV 16
      .
101 KKSTHPLSEVAVHNKPSDC.....WIVVKNKVYDVSNFADEHPGGSVIS 144
      | | . : . : :||. .| :||| |
17 AK..HNAATISTQERLCSLSSLKGEEVCIDGIIYDLQSF..DHPGGETIK 62
      .
145 TYFGRDGTDFVSSFHAASTWKILQDF.YIGDVERVEPTPELLKDF.REM. 191
      : | | | : | | | : :| | . :| ||.
63 MFGGNDVTVQYKMIHPYHTEKHLEKMKRVGKVTDVCEYKFDTEFEREIK 112
      .
192 RALFLREQLFKS.SKLYYVMKLLTNVAIFAASIAIICWSKT.ISAVLASA 239
      | .| . | : : :|| | | | .|| |
113 REVFKIVRRGKDFGTLGWFFRAFCYIAIF..FYLQYHWVTGTGTSWLLAVA 160
      .
240 CMMALCFQQCGWLSHDFLHNQVFETRNLNEVVGYNVGNVAVLGFSTGWWKE 289
      .. . || | . |. :..| :| :| | |.
161 YGISQAMIGMN.VQHDANHGATSKRPWVNDMLG..LGADFIGGSKWLWQE 207
      .
290 KHNHLHHAAPNECDQTYQPIDEDIDTLPLIAWSKDILATVENKTFLRILQY 339
      .| ||| | : | : |:: .. | :|. | :
208 QHWTHHAYTNHAEM..DP..DSFGAEPMLLFN.DYPLDHPARTWLH..RF 250
      .
340 QHLFFMGLLFFARGSWLFWWR.....YTSTAVLS...PVDRLLEKGTVL 381
      | :| .| | | . || .|
251 QAFFYMPVL...AGYWLSAVFNPQILDLOQRGALSVGIRLDNAFIHSRRK 297
      .
382 FHYFW...FVG...TACYLLPG...WKPLVWMAVTELMGMLLGFFV 420
      : || : : | | | : . . : | .|
298 YAVFWRAVYIAVNVIAPFYTNSSGLEWSWRVFGNIMLMGVAESLALAVLFS 347
      .
421 LSHN.....GMEVYNSSKEFVSAQIVSTRDIKGNIFNDWFTGGLN 460
      |||| :. :. || | | . |||||
348 LSHNFESADRDPTAPLKKTGEPVDWFKTQ.VETSCITYGGFLSGCFTGGLN 396
      .
461 RQIEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVYEDVS.IATGTCKVLKA 509
      |: ||||| | |||: | |||. | :
397 FQVEHHLFPRMSSAWYPYIAPKVREICAKHGVHYAYYPWIHQNFLSTVRY 446
      .
510 LKEVAEAAA.EQHATTS..... 525
      : | | | . |
447 MHAAGTGANWRQMARENPLTGRA. 469

```


Figur 6: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Δ -12-Desaturase aus *Mortierella alpina* (Ma_des12) obere Reihe mit der homologen Sequenz aus *Phaeodactylum tricornutum* (Pt_des12) in der unteren Reihe

```

40 KEIRECIPAHCFERSGLRGLCHVAIDL TWASLL..FLAATQIDKFE..NP 85
   |::| || ||| : | ::| | : : ||
107 KDLRAVIPKDCFEPDTAKSLGYLSVS.TMG TILCSVVGANLLSVLDPSNP 155
   . . . . .
86 LIRYLAWPVYWIMQGIVCTGVWVLAHECGHQSFSSTKLTNN TVGWILHSM 135
   | : | | . | | |.||||||| |. || ::| . ||::||.
156 L.TWPLWAAYGAVTGT VAMGLWVLAHECGHGAFSKN RSLQDAVGYYIHSI 204
   . . . . .
136 LLVPYHSWRISHSKHHKATGHMTKDQVFVPKTRSQVGLPPKENAAA VQE 185
   :||| ||. ||. ||. | || : || . | | . | |
205 MLVPYFSWQRSHAVHHQYTNH MELGETHVPDRADKEG....EKS LALRQF 250
   . . . . .
186 EDMSVHLDEEAPIVTLFWMVIQFLFGWPAYLIMNASGQDYGRWTS HFHTY 235
   | | . : : |||||:: |. | |. ||:
251 MLDSFGKDKGMKAYGGLQSFLHLIVGWPAYLLIGATGGPD RGMTNHFYP. 299
   . . . . .
236 SPIFEP....RNFF.....DIIISDLGVLAALGALIYASMQLSLL TVTK 275
   .|: | : | : ||::| |. ||| . | |
300 NPLSTPTQPKKELFPGNWKEKVYQSDIGIAAVVGALIAWTAT SGLAPVMA 349
   . . . . .
276 YYIVPYLFWNFVLVLITFLQHTDPKLPHYREGAWN FQRGALCTVDRSFGK 325
   | | : :| ||| |. |||| |. ||: || :|| |::| : |
350 LYGGPLIVINAWLVLYTWLQHTD TDVPHFSSDNHNFVK GALHTIDRPYDK 399
   . . . . .
326 .....FLDHMFHGIVHTHVAHHLFSQMPFYHAE EATYHLKKLLGEYYVYD 370
   :| : | | ||||| |. | | |: || :| | |. ||
400 LDPWGIIDFLHHKIGTTHVAHHFDSTIPHYKAQIATDAIKAKFP EVLYD 449
   . . . . .
371 PSPIVVAVWRSFREC RFVEDQGDVVFFK 398
   |. || |. || : | || . || . |
450 PTPIPQAMWRVAKGCTAVEQRGDAWVWK 477

```

Figur 7: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Δ -12-Desaturase aus *Mortierella alpina* (Ma_des12) obere Reihe mit der homologen Sequenz aus *Phaeodactylum tri-cornutum* Klon PT001072031R (Pt_des12.2) in der unteren Reihe.

```

      .       .       .       .       .
22 NSAKPAFERNYQLPEFTIKEIRECIPAHCFERSGLRGLCHVAIDL TWASL 71
   .| | . . :| | :|: || ||:| | :. || |.
33 SSYNPLAKDSPELP..TKGQIKAVIPKECFQRSAFWSTFYLMRDLAMAAA 80

      .       .       .       .       .
72 LFLAATQIDKFENP.....LIRYLAWPVYWIMQGIVCTGVWVLAHECGH 115
   .|: : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
81 FCYGTSQVLSTDL PQDATLILPWALGWGVYAFWMGTILTGPWVVAHECGH 130

      .       .       .       .       .
116 QSFSTSKTLNNTVGWILHSMLLVPHYHSWRISHSKHHKATGHMTKDQVFVP 165
   .:| |. | |. | |. | | | | | | | | | | | | | | | |
131 GAYSDSQTFNDVVGFIVHQALLVPYFAWQYTHAKHHRRTNHLVDGESHPV 180

      .       .       .       .       .
166 KTRSQVGLPP..KENAAA VQEEDMSVHLDEEAPIVTLFWMVIQFLFGWP 213
   | | | | | . | . | | | | | : | | | | | | | | | |
181 STAKDNGLGPHNERN SFYAAWHEAMG....DGAFAVFQVWS..HLFVGWP 224

      .       .       .       .       .
214 AYLI.MNASGQ..DYGRW.....TSHFHTYSPIFEPRNFFDIIISDLG 253
   || : ..|. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
225 LYLAGLASTGKLAHEGWLEERNAIADHFRPSSPMFPAKIRAKIALSSAT 274

      .       .       .       .       .
254 VLAALGALIYASMQLSLLTVTKYYIVPYLFVNFVWLVLITFLQHTDPKLP 303
   || | | |:| |. | | :| | | | | | | | | | | | | | |
275 ELAVLAGLLYVGTQVGHLPVLLWYWGPTYFVNAWLVLTYTLQHTDPSIPH 324

      .       .       .       .       .
304 YREGAWNFRGALCTVDRSFGKFLDHMFHGIVHTHVAHHLFSQMPFYHAE 353
   | | | | . :| | | |:| | :| | | | | | | | | | | |
325 YGEGEWTWVKALSTIDRDYGIF.DFFHHTIGSTHVVHHLFHEMPWYNAG 373

      .       .       .       .       .
354 EATYHLKKLLGE..YYVYDPSPIVVAVWRSFRECRFVEDQGDVVFFK 398
   || .|. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
374 IATQKVKEFLEPQGLYNYDPTPWYKAMWRIARTCHYVESNEGVOYFK 420

```